

Exzitonische Wechselwirkungen zwischen Lichtsammelpigmenten als Beitrag zur Photoprotektion in Pflanzen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Stefan Bode
aus Wolfenbüttel

1. Referent:	Prof. Dr. Peter Jomo Walla
2. Referent:	Prof. Dr. Karl-Heinz Gericke
eingereicht am:	27.05.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am:	06.07.2009

Druckjahr 2009

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Bode, S; Quentmeier, CC; Liao, P-N; Hafi, N; Barros, T; Wilk, L; Bittner, F; Walla, PJ: On the formation of excitonic carotenoid dark state – chlorophyll regulating plant photosynthesis, **2009**, PNAS, accepted.

Bode, S; Quentmeier, CC; Liao, P-N; Barros, T; Walla, PJ: Xanthophyll-Cycle Dependence of the Energy Transfer between Carotenoid Dark States and Chlorophylls in NPQ Mutants of Living Plants and LHCII, **2008**, Chemical Physics Letters 450, 379-385.

Tagungsbeiträge

Bode, S; Liao, P-N; Quentmeier, CC; Walla, PJ: The Regulation of Photosynthesis is linked to Strong Electronic Carotenoid Dark-State – Chlorophyll Couplings. (Poster), **2008**, ESF Workshop: Novel Methods in Exploring Carotenoid Excited State Dynamics, Nové Hrad, Tschechien.

Quentmeier, CC; Bode, S; Wehling, A; Walla, PJ: Two-Photon Excitation Studies on the Role of Carotenoid Dark States in the Regulation of Plant Photosynthesis. New Insights by measuring NPQ-Mutants and Dark Light Adaptation. (Poster), **2007**, 14th International Congress of Photosynthesis, Glasgow, Großbritannien.

Bode, S; Quentmeier, CC; Liao, P-N; Walla, PJ: Set-up for Simultaneous Measurements of One-Photon and Two-Photon Fluorescence in Living Plants and Isolated Pigment-Protein Complexes. (Poster), **2007**, 14th International Congress of Photosynthesis - Satellite Meeting, Drymen, Großbritannien.

Wehling, A; Bode, S; Walla, PJ: A Two Photon Excitation Study on the Role of Carotenoid Dark States in the Regulation of Plant Photosynthesis. (Poster), **2006**, Gordon Conference on Photosynthesis, Smithfield, USA.

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit.....	1
2 Theorie.....	4
2.1 Allgemeine Einleitung in die Photosynthese	4
2.2 Chloroplasten	5
2.3 Lichtreaktionen.....	6
2.3.1 Photosystem II.....	7
2.3.2 Lichtsammelantennen.....	9
2.3.3 Cytochrom <i>b₆f</i>	14
2.3.4 Photosystem I	15
2.3.5 ATP-Synthase.....	16
2.4 Dunkelreaktionen	17
2.5 Struktur und Spektroskopie der Lichtsammelpigmente	18
2.5.1 Chlorophylle.....	18
2.5.2 Carotinoide	20
2.6 Komponenten des nicht-photochemischen <i>Quenchings</i>	25
2.7 Energietransfermechanismen	27
2.7.1 Förster-Energietransfer.....	28
2.7.2 Dexter-Energietransfer	31
2.8 Exzitonische Zustände.....	32
3 Experimenteller Teil	35
3.1 Lasersystem.....	35
3.1.1 Vitesse Duo	36
3.1.2 Regenerativer Verstärker (RegA 9000).....	37
3.1.3 Optisch parametrischer Verstärker (OPA 9400)	40
3.2 PAM Fluorometer (Pulse Amplitude Modulation)	42
3.3 Messaufbau zur simultanen Fluoreszenz-Detektion	44
3.4 Wechselwirkungsparameter $\Phi_{Kopplung}^{Car S_I-Chl}$	47
3.5 Absorptionsspektrometer	50
3.6 Probencharakterisierung.....	50
3.6.1 Isolierte Lichtsammelproteine.....	50
3.6.2 Messungen bei verschiedenen pH-Werten	52
3.6.3 Pflanzenmutanten	52
4 Ergebnisse	54
4.1 Einführung.....	54
4.1.1 Ergebnisse	56
4.1.2 Diskussion	61
4.2 Messungen an den kleineren Chlorophyll-Proteinen	64

4.2.1	Ergebnisse	64
4.2.2	Diskussion	70
4.3	Messungen an Pflanzen <i>in vivo</i>	72
4.3.1	Ergebnisse	72
4.3.2	Diskussion	74
5	Zusammenfassung und Ausblick	77
6	Danksagung.....	80
7	Literaturverzeichnis.....	82
8	Anhang	88
9	Lebenslauf.....	91

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström	nano	10^{-9}
a.u.	<i>Arbitrary Unit</i>	ND	<i>Neutral Density</i>
ADP	Adenosindiphosphat	Nd:YVO ₄	Neodym: Yttrium Vanadat
ATP	Adenosintriphosphat	NDM	<i>Negative Dispersion Mirror</i>
BBO	Beta-Barium-Borat	NG	β -Nonyl β -D-glucopyranosid
Car	Carotinoid	NPQ	<i>Non-Photochemical Quenching</i>
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>	ns	Nanosekunden
Chl <i>b</i>	Chlorophyll <i>b</i>	OD	optische Dichte
CP	<i>Cubic Polarizer</i>	OPA	Optical Parametric Amplifier
CP	Chlorophyll-Protein	P680	Reaktionszentrum im PSII
<i>cw</i>	<i>Continuous Wave</i>	P700	Reaktionszentrum im PSI
DDM	n-Dodecylmaltosid	Pc	Plastocyanin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	pico	10^{-12}
ϵ_A	Absorptionsspektrum des Akzeptors	PQ	Plastoquinon
Fd	Ferredoxin	PQH ₂	Plastoquinol
f_D	Fluoreszenzspektrum des Donors	ps	Picosekunden
Femto	10^{-15}	PSI	Photosystem I
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital	PSII	Photosystem II
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie	qE	energieabhängige <i>Quenchen</i>
J_{AD}	spektraler Überlappungsbereich	qI	photoinhibitorische <i>Quenchen</i>
<i>K</i>	Maß für spezifische Orbitalwechselwirkungen	qN	nicht-photochemisches <i>Quenchen</i>
k_{ET}	Energietransfer Geschwindigkeitskonstante	qP	photochemisches <i>Quenchen</i>
k_f	Strahlungsemission Geschwindigkeitskonstante	<i>Quenchen</i>	Abfangen von Energie
κ^2	Orientierungsfaktor	<i>r</i>	Abstand
kDa	Kilodalton	R_0	Förster Radius
<i>L</i>	Summe der van-der-Waals Radien	RegA	<i>Regenerative Amplifier</i>
LBO	LiB ₃ O ₅	ρ	Korrelationskoeffizient
LHCII	Light Harvesting Complex II	RNA	Ribonukleinsäure
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital	SHG	<i>Second Harmonic Generation</i>
μ	micro (10^{-6})	τ	Lebenszeit
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	Ti:S	Titan-Saphir
<i>n</i>	Brechungsindex	TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenosin Dinucleotid-Phosphat	VDE	Violaxanthin-De-Epoxidase
		Vio	Violaxanthin
		VPUF	Verdi-Pumped Ultra Fast
		Zea	Zeaxanthin

1 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

Die Nutzung der Sonnenenergie durch den Prozess der Photosynthese besitzt eine fundamentale Bedeutung für die Existenz von Leben auf der Erde. Durch die aufgenommene Energie können photosynthetisch aktive Lebensformen biochemische Reaktionen durchführen, in denen sie die Grundsubstanzen synthetisieren, die als Basis für alle weiteren in ihrem Organismus ablaufenden Biosynthesen dienen. Da Pflanzen und photosynthetisch aktive Bakterien der Ausgangspunkt der Nahrungskette für alle anderen Lebewesen sind, hängt das Leben in großem Maße von der Photosynthese ab. Des Weiteren ist der als Abfallprodukt entstehende Sauerstoff für die Atmung von Menschen und Tieren überlebensnotwendig. Aus diesen Gründen ist die Erforschung der einzelnen Prozesse, die bei der Photosynthese ablaufen, für die Wissenschaft von großem Interesse. Darüber hinaus könnten durch ein Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen des Lichtsammelns und der Lichtnutzung Beiträge zur Lösung des Energieproblems gefunden werden.

Während die generelle Funktionsweise der Photosynthese bereits bekannt ist, existieren einige Prozesse, deren Mechanismen noch nicht aufgeklärt werden konnten. So sind Pflanzen beispielsweise im Laufe eines Tages starken Helligkeitsschwankungen ausgesetzt, die ein Umschalten des Photosyntheseapparates erforderlich machen.^[1] Bei niedrigen Lichtintensitäten müssen die Pflanzen möglichst viel Energie sammeln und dem Photosyntheseprozess zuführen, der die Voraussetzung für ihr Wachstum ist. Bei hoher Lichteinstrahlung müssen sie sich jedoch an die veränderten Bedingungen anpassen und für eine Umwandlung von überschüssiger Energie in Wärme sorgen, um eine Beschädigung des Photosyntheseapparates durch oxidative Prozesse zu verhindern.^[1] Dieses Abfangen überschüssiger Energie durch den Photosyntheseapparat der Pflanzen wird auch als *Non-Photochemical Quenching* (NPQ) bezeichnet. Da dieses *Quenchen* essenziell für das Überleben von natürlichen und genmanipulierten Pflanzen ist, handelt es sich um ein intensiv diskutiertes Forschungsgebiet. Trotz zahlreicher Untersuchungen existiert noch kein allgemein akzeptiertes Modell zur Beschreibung der molekularen Prozesse, die zum *Quenchen* führen.^[2-5]

Eine große Rolle scheinen jedoch bestimmte Lichtsammelpigmente, die Carotinoide (Car), bei den *Quenching*-Prozessen zu spielen. Unter hoher Sonneneinstrahlung findet eine Helladaption des Photosyntheseapparates statt, in dessen Verlauf eine pH-Wert induzierte Umwandlung des Carotinoids Violaxanthin (Vio) in Zeaxanthin (Zea) stattfindet (s. Abb. 1).^[1] Genmanipulierte Pflanzen ohne die Möglichkeit dieser Umwandlung zeigten eine stark verringerte Fähigkeit zum *Quenchen*, was eine direkte Beteiligung von Zea am Schutzmecha-

nismus nahe legt.^[6, 7] Eine besondere Bedeutung wird dabei dem ersten angeregten Zustand der Carotinoide (S_1) zugeschrieben, der eine ähnliche Energie wie der erste angeregte Zustand der Chlorophyll Lichtsammelpigmente (Q_y) besitzt und somit mit diesem wechselwirken könnte.^[8]

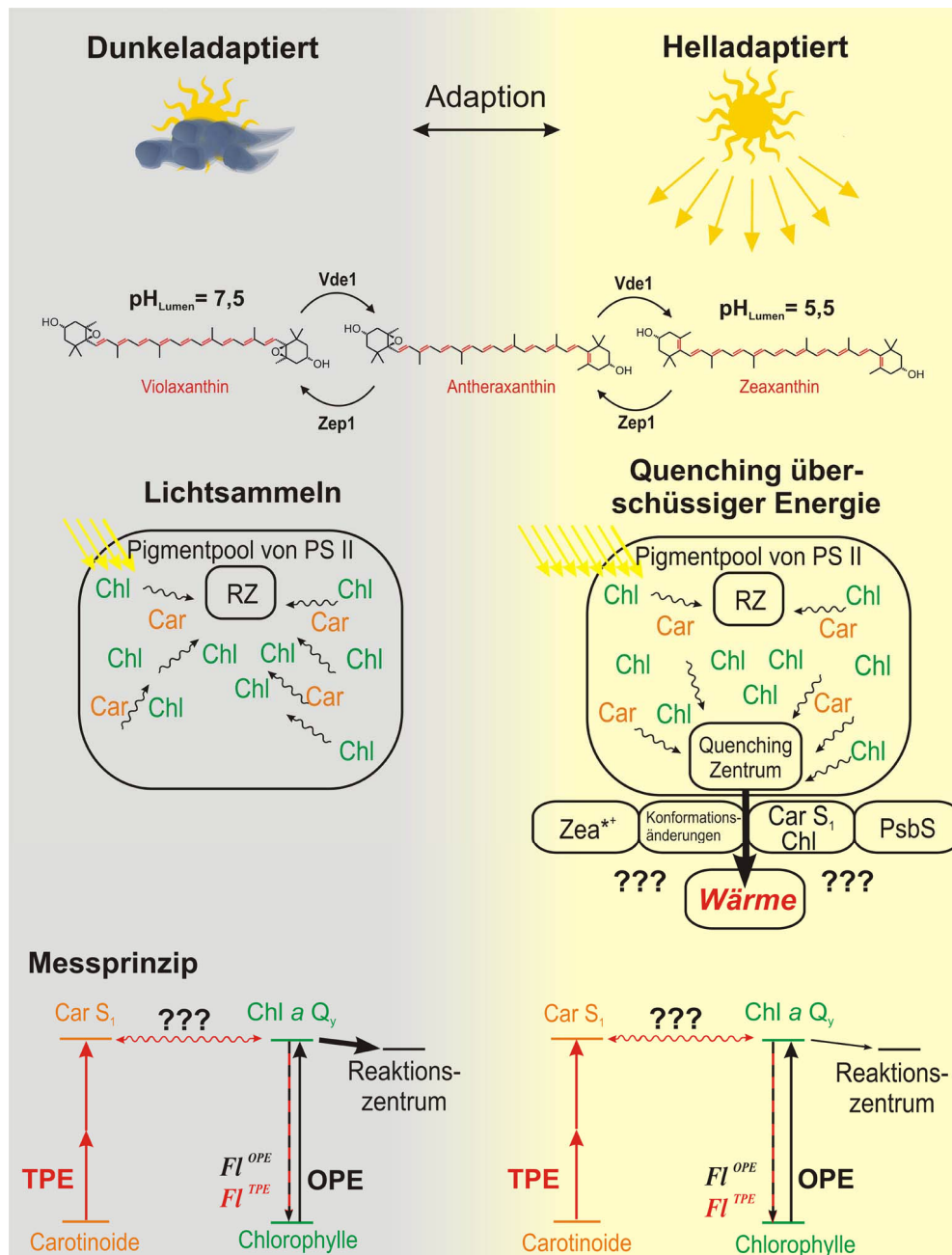


Abb. 1: oben/mitte: Schema zur Reaktion von Pflanzen auf sich ändernde Lichtverhältnisse und mögliche Prozesse zur Abführung der überschüssigen Energie. **unten:** Verwendetes Messprinzip zur Untersuchung des Anteils der Carotinoide am *Quenching*-Prozess.^[9]

Eine direkte Untersuchung der Beteiligung des Carotinoid S_1 Zustandes mittels konventioneller Ein-Photonen-Anregung (*One-Photon Excitation*, OPE) scheitert jedoch an dem Umstand,

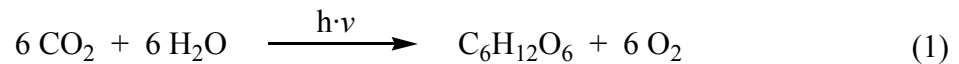
dass die Anregung aus dem Grundzustand in den ersten angeregten Zustand $S_0 \rightarrow S_1$ aufgrund der Auswahlregeln verboten ist.^[10] Eine Lösung für dieses Problem stellt die Zwei-Photonen-Anregung (*Two-Photon Excitation*, TPE) dar, für die umgekehrte Auswahlregeln gelten und somit eine direkte Anregung des S_1 -Niveaus möglich ist.^[11]

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein Messaufbau entworfen, bei dem eine Kombination aus OPE und TPE an derselben Stelle der Probe zur selben Zeit stattfinden und die nach der Anregung von den Chlorophyllen emittierte Fluoreszenz gemessen werden kann (s. Abb. 1 unten). Damit ist es möglich, den Energiefluss von Carotinoid zu Chlorophyll zu untersuchen und somit einen direkten Einblick in die Wechselwirkung der Zustände zu erhalten. Mit dem Aufbau besteht die Möglichkeit Messungen sowohl an sich in Lösung befindlichen isolierten Lichtsammelkomplexen als auch direkt an Pflanzen durchzuführen. Somit können durch vergleichende Messungen an Proben mit unterschiedlicher Carotinoid- oder Protein-Zusammensetzung Einblicke zum Beitrag der einzelnen Bestandteile des Photosyntheseapparates am *Quenching*-Prozess gewonnen werden.

2 Theorie

2.1 Allgemeine Einleitung in die Photosynthese

Unter Photosynthese wird der biochemische Prozess verstanden, bei dem Pflanzen aus Wasser und Kohlenstoffdioxid unter Absorption von Sonnenlicht Hexosen und Sauerstoff erzeugen. Die vereinfachende Grundgleichung der Photosynthesereaktion lautet:



Während der Sauerstoff für die Pflanzen ein Abfallprodukt ist, wird die gebildete Hexose für die Synthese aller weiteren von der Pflanze benötigten Verbindungen verwendet, welche die Grundlage des Nahrungskreislaufes auf der Erde bilden. Des Weiteren wird der erzeugte Sauerstoff von Menschen und Tieren zur Atmung benötigt. Somit stellt die Photosynthese für das Leben auf der Erde einen äußerst wichtigen Prozess dar. Doch auch die Kapazität zur Fixierung des Treibhausgases Kohlendioxid in organischen Molekülen ist für das Ökosystem wichtig, da hierdurch die Gesamtkonzentration an Kohlenstoffdioxid in der Atmosphäre sinkt und so das Leben erst ermöglicht wird.^[12]

Die Photosynthese beginnt mit der Absorption des Sonnenlichtes durch Lichtsammelpigmente, deren wichtigsten Vertreter die Chlorophylle und die Carotinoide sind (s. Kapitel 2.5). Sie befinden sich in den Blättern der Pflanzen und sind in Proteinen gebunden, die die Pigmente in bestimmten Positionen fixieren (s. Kapitel 2.3). Diese pigmentbindenden Proteine werden auch als Photosysteme bezeichnet.

Nach erfolgter Absorption muss die Energie schnellstmöglich an das Reaktionszentrum des jeweiligen Photosystems weitergeleitet werden, in dem die Nutzung der Lichtenergie beginnt. Durch die schnelle Übertragung werden Konkurrenzprozesse minimiert, die die Energiesammel-Ausbeute verringern würden. Die Energieübertragung erfolgt schrittweise von Pigment zu Pigment mittels des Förster-Energietransfers (s. Kapitel 2.7). Das Reaktionszentrum wird aus zwei dicht beieinander befindlichen Chlorophyll-Pigmenten gebildet. Durch ihre räumliche Nähe zueinander kommt es zu Wechselwirkungen, in deren Folge ihr erstes angeregtes Energieniveau abgesenkt wird (s. Kapitel 2.8) und sie somit als Energietrichter dienen können, in den sämtliche im Photosystem absorbierte Energie fließt.

Ist die Energie auf das Reaktionszentrum übertragen, muss eine Ladungstrennung erfolgen, in deren Folge die Energie stabilisiert wird und somit zur Betreibung der Biosynthesen zur Verfügung stehen kann. Die Prozesse der Lichtabsorption, Weiterleitung der Energie ans

Reaktionszentrum und Umwandlung der Energie in für die Pflanze verwendbare Form, wird auch unter dem Begriff Lichtreaktion zusammengefasst. Die sich daran anschließenden biochemischen Synthesen von Hexose aus Kohlendioxid werden im Gegensatz dazu als Dunkelreaktion bezeichnet (s. Abb. 2).^[13]

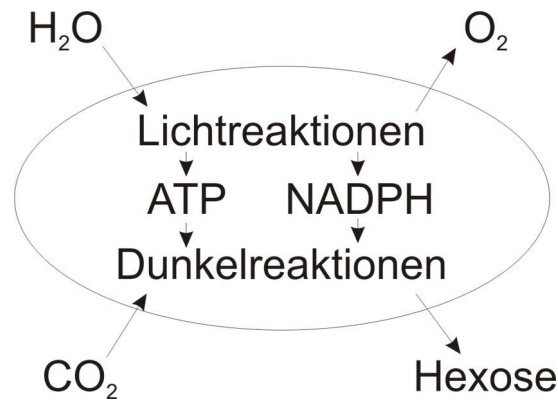


Abb. 2: Vereinfachendes Schema der Reaktionswege in der Pflanze zur Erzeugung von Hexose (frei nach ^[14]).

2.2 Chloroplasten

In den Eukaryoten (höhere Pflanzen und Algen) läuft die Photosynthese in den Chloroplasten ab. Durch genetische Studien weiß man, dass Chloroplasten aus ehemals Photosynthese betreibenden Bakterien hervorgegangen sind, die von primitiven eukaryotischen Zellen einverleibt worden sind.^[15] Diese Theorie wurde durch jüngere Beobachtungen in interessanter Weise veranschaulicht, da im Tierreich Arten entdeckt wurden, die durch Aufnahme von Chloroplasten Photosynthese betreiben können.^[16] Darüber hinaus können Teile der Erbinformationen der aufgenommenen Chloroplasten in die DNA der Tiere übergehen.^[17]

Chloroplasten besitzen eine Länge von ca. 5 μm und sind durch eine äußere und eine innere Membran umgeben (s. Abb. 3). In ihrem Inneren befindet sich das Stroma, wobei es sich um eine konzentrierte Enzymlösung handelt, in der die Hexosesynthese abläuft. Des Weiteren befinden sich im Stroma DNA, RNA und Ribosomen. Im Stroma schwimmen in Scheiben gestapelte Doppelmembranen, die als Thylakoide bezeichnet werden und in denen sich die Lichtsammelkomplexe befinden. In ihnen laufen die Prozesse der Lichtabsorption und Energieumwandlung ab. Der Innenraum der Thylakoide, das so genannte Lumen, wird durch die Doppelmembran von dem Stroma räumlich getrennt.^[18]

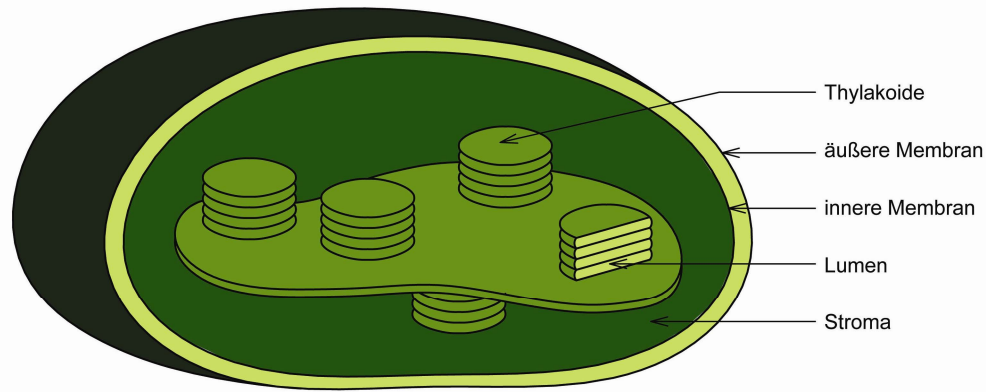


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Chloroplasten (frei nach ^[12]).

Diese räumliche Trennung mit den dazwischen liegenden Komponenten des Photosyntheseapparates ist von entscheidender Bedeutung für die Nutzung der Sonnenenergie und wird später eingehender beleuchtet.

2.3 Lichtreaktionen

In die Thylakoid-Membran sind Proteine eingebettet, die die zur Absorption verwendeten Lichtsammelpigmente enthalten (s. Abb. 4).

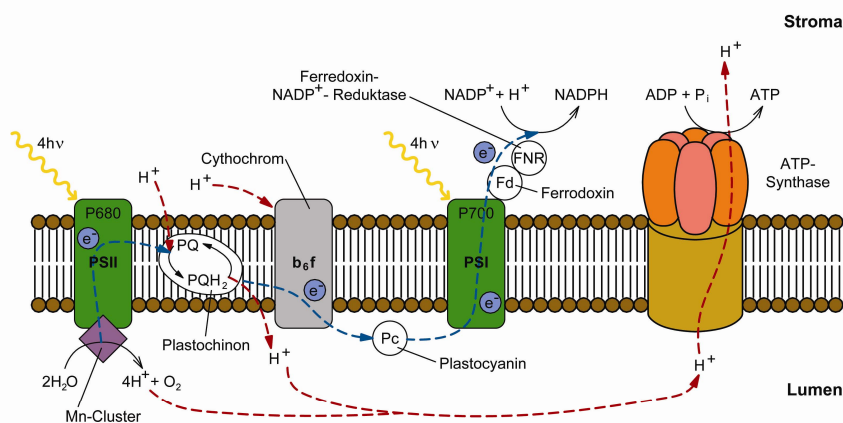


Abb. 4: Einbettung der an der Photosynthese beteiligten Proteine in die Thylakoidmembran (frei nach ^[12]).

Die beiden Hauptproteine werden als Photosystem I und II (PSI bzw. PSII) bezeichnet und sind in Reihe geschaltet. Durch Lichtabsorption und anschließende Ladungstrennung in ihren Reaktionszentren bauen sie mit dem kleineren Protein Cytochrom *b₆f* einen Protonengradienten über die Thylakoid-Membran auf. Dieser Protonengradient kann wiederum von der ATP-Synthase zur Synthese vom Energieträger ATP benutzt werden, der die weiteren Schritte der Dunkelreaktionen erst ermöglicht. Die in Reihe geschalteten Photosysteme (s. Abb. 5) bauen

ein Reduktionspotenzial auf und übertragen die gespeicherte Energie an die NADP-Reduktase, welche das Molekül NADPH erzeugt, das als Reduktionsmittel für die Dunkelreaktion benötigt wird.^[12]

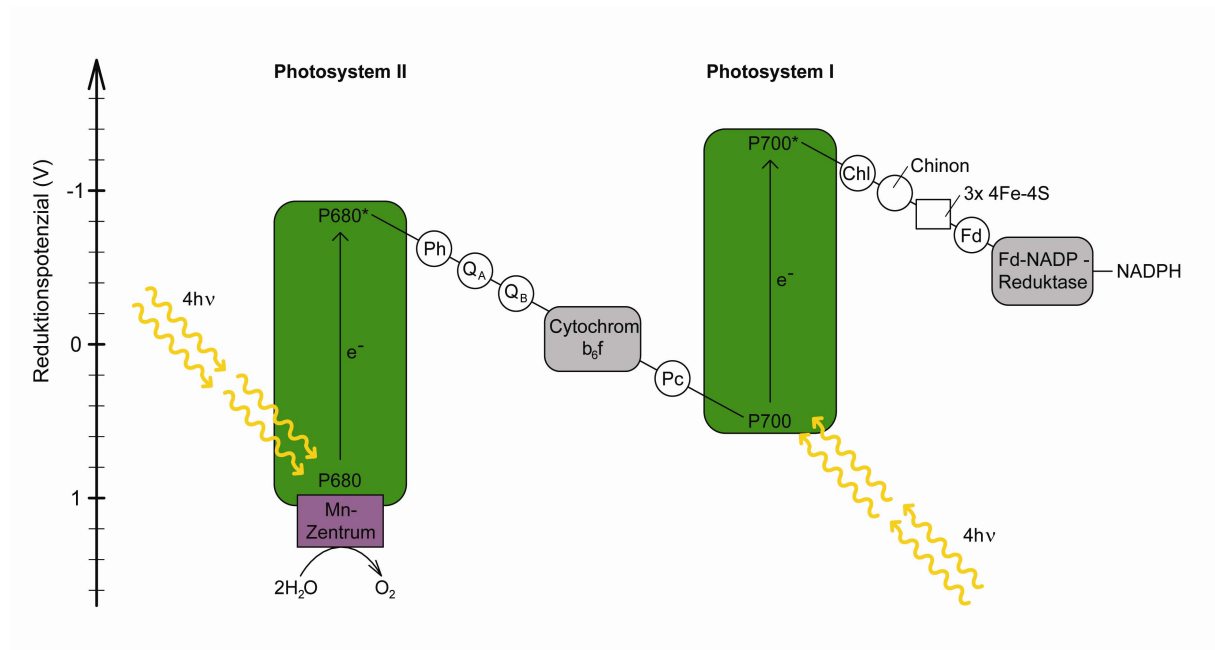


Abb. 5: Z-Schema zur Veranschaulichung des Elektronenflusses vom Wasser zum NADPH (frei nach ^[12]).

Die an der Lichtreaktion beteiligten Proteine und die in ihnen ablaufenden Reaktionen werden im Folgenden im Detail vorgestellt.

2.3.1 Photosystem II

Das PSII enthält etwa 35 Moleküle Chlorophyll a und 11 Moleküle β -Carotin.^[19] In der Natur kommt es als Dimer vor und ist von weiteren kleineren Lichtsammelkomplexen umgeben, die zusätzlich zum Lichtsammeln beitragen (s. Kapitel 2.3.2).

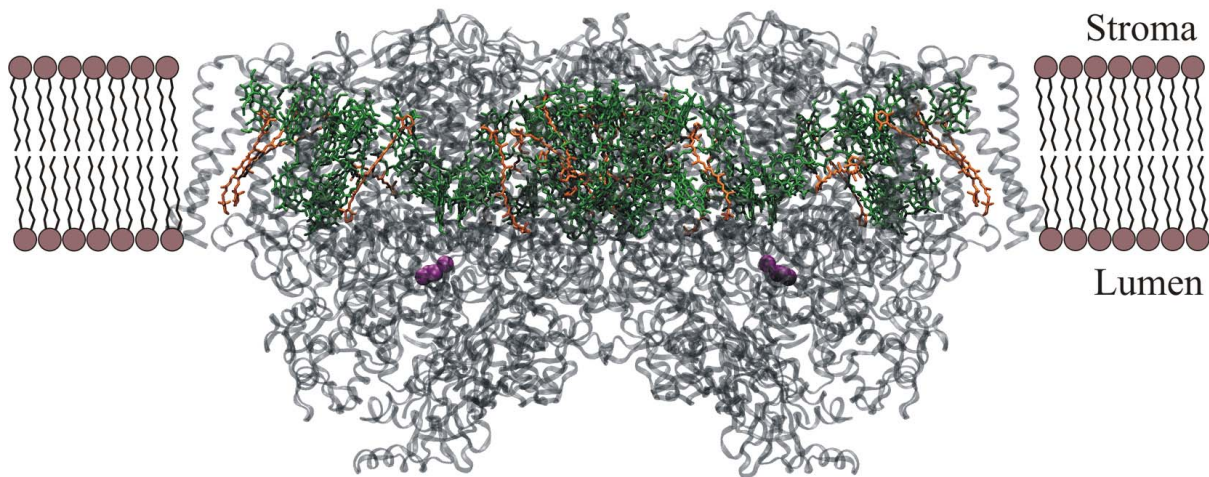


Abb. 6: Einbettung des PSII-Dimers in die Thylakoidmembran nach Daten von Loll *et al.*^[20] grün: Chl *a*, orange: β -Carotin, grau: Polypeptid, lila: Mn-Cluster.

Durch die Lichtabsorption wird das jeweilige absorbierende Pigment in einen angeregten Zustand versetzt. Es folgt der schrittweise Transfer der Energie zum Reaktionszentrum, welches durch zwei dicht beieinander liegende Chlorophyll *a*-Moleküle gebildet wird, die auch als spezielles Paar (*Special Pair*) bezeichnet werden (s. Abb. 7). Durch ihre räumliche Nähe sind sie exzitonisch gekoppelt, wodurch ihr energetischer Zustand abgesenkt wird (s. Kapitel 2.8). Da ihr Absorptionsmaximum bei 680 nm liegt, werden sie auch als P680 bezeichnet.^[14]

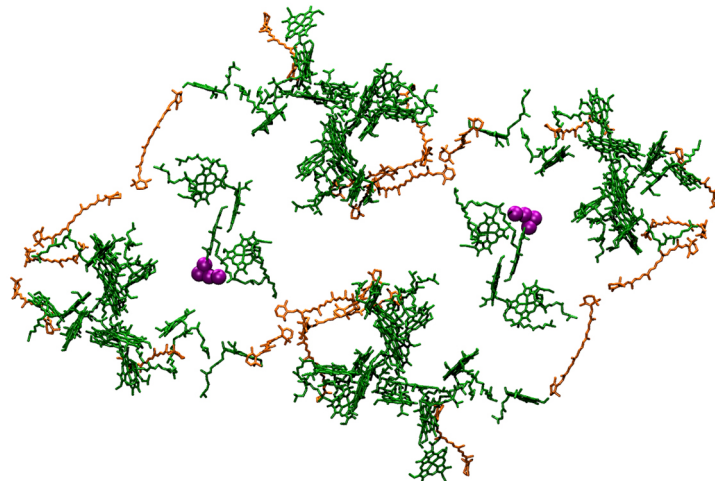


Abb. 7: Draufsicht auf die Lichtsammelpigmente eines PSII-Dimers nach Daten von Loll *et al.*^[20] Die Mn-Cluster liegen in unmittelbarer Nähe zum *special pair*. grün: Chl *a*, orange: β -Carotin, lila: Mn-Cluster.

Nach der Anregung des *Special Pair* erfolgt die Übertragung der Energie auf ein benachbartes Phäophetyn, wobei es sich um ein mit den Chlorophyllen verwandtes Molekül handelt. Dieser Energietransfer muss ebenso wie der Energietransfer zum *Special Pair* sehr schnell erfolgen, um eine Abgabe des Lichts in Form von Fluoreszenz oder Wärme zu verhindern.^[13] Von dort

wird die Energie zunächst auf ein Plastochinon Molekül übertragen und dann weiter auf ein nächstes Plastochinon, welches reduziert wird. Nach zweifacher Lichtabsorption und Übertragung zweier Elektronen liegt das am Ende der Kette stehende Plastochinon in zweifach reduzierter Form vor. Somit wird die Energie in Form eines Reduktionspotentials gespeichert. Das nach der Ladungstrennung positiv geladene *Special Pair* P680⁺ ist ein starkes Oxidationsmittel und kann somit Wassermoleküle, die an einen Mangankomplex gebunden sind, zu Sauerstoff und Protonen oxidieren. Mangan kann sehr viele Oxidationsstufen einnehmen, so dass der Mangankomplex über mehrere Oxidations- und Reduktionsschritte die Aufnahme der Elektronen optimal katalysieren kann.^[18]

Um die vollständige Umwandlung von einem Wassermolekül zu Sauerstoff und Protonen durchzuführen, müssen vier Elektronen absorbiert werden. Damit lautet die Gesamtreaktionsgleichung, die im PSII abläuft:



2.3.2 Lichtsammelantennen

Um die PSII-Kernkomplexe ordnet sich eine Vielzahl von kleineren Proteinen an, die ebenfalls Lichtsammelpigmente enthalten und als Antennenkomplexe oder Lichtsammelantennen bezeichnet werden. Es bilden sich Superkomplexe, deren Struktur durch Elektronenmikroskopie aufgelöst wurde (s. Abb. 8).^[21] Die Lichtsammelantennen absorbieren durch die in ihnen enthaltenen Pigmente einfallendes Licht und tragen in erheblichem Maße zum Lichtsammelvermögen bei. Im Gegensatz zu den PSII-Kernkomplexen besitzen sie jedoch kein *Special Pair* und sind somit nicht in der Lage, selbst eine Ladungstrennung herbeizuführen.

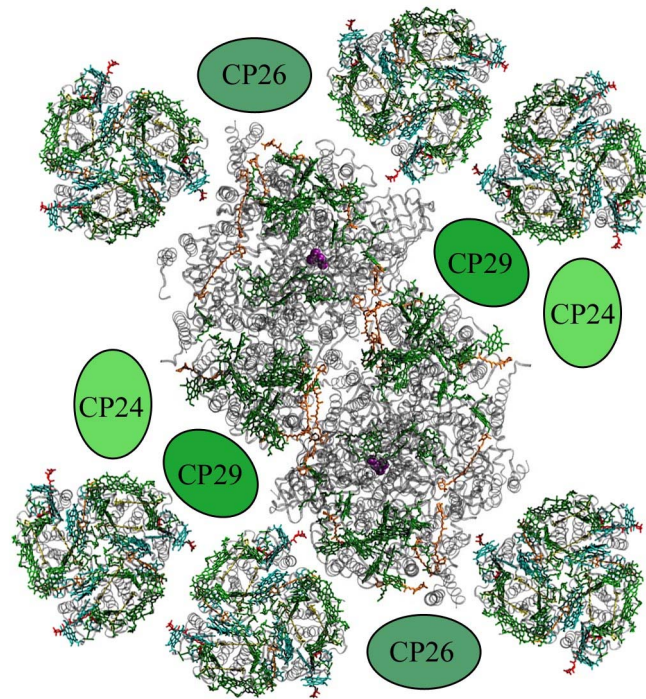


Abb. 8: PSII-Superkomplex (nach Daten von^[20, 22] frei nach^[21]) bestehend aus dem zentral liegenden PSII-Dimer, 6 trimeren LHCII und den kleineren Chlorophyll-Proteinen CP24, CP26 und CP29, von denen noch keine Kristallstruktur aufgelöst werden konnte.

Nach erfolgter Lichtabsorption übertragen sie die Energie vielmehr auf die mit ihnen assoziierten Kernkomplexe, in denen es schließlich zur Ladungstrennung kommen kann. Diese Energieübertragung funktioniert nach dem Trichter-Prinzip. Während die äußeren Antennenkomplexe eher im kurzwelligen Spektralbereich absorbieren, absorbieren dichter am *Special Pair* liegende Pigmente eher im längerwelligeren. Somit ergibt sich ein Energiegefälle im Superkomplex, über das die Energie schrittweise auf das energetisch am niedrigsten liegende *Special Pair* übertragen werden kann.^[13]

Interessanterweise verfügen alle Photosynthese betreibenden Pflanzen und Bakterien auf Chlorophyll-Basis über Lichtsammelantennen.^[13] Es scheint, dass ihnen spezielle Aufgaben zukommen, die nicht durch eine einfache Vergrößerung der Kernkomplexe hätte erreicht werden können. Eine besondere Aufgabe ist beispielsweise ihre Teilnahme am NPQ-Prozess, was durch viele Experimente nachgewiesen werden konnte.^[23-25]

2.3.2.1 Lichtsammelkomplex II

Der Lichtsammelkomplex II (LHCII) ist der häufigste Antennenkomplex in höheren Pflanzen und übernimmt neben dem Sammeln von Licht eine Vielzahl von Aufgaben wie z. B. dem Schutz vor zu hohen Lichtintensitäten. Im PSII-Superkomplex stellt er etwa zwei Drittel der

Chlorophylle und Carotinoide, so dass er einen wesentlichen Anteil an der Nutzung der Photosynthese auf der Erde besitzt.^[26]

Der Komplex (s. Abb. 9) liegt *in vivo* als Trimer vor. Sämtliche in ihm enthaltenen Pigmente und ihre Positionen im Komplex konnten mittels Röntgenstrukturanalyse identifiziert werden.^[22]

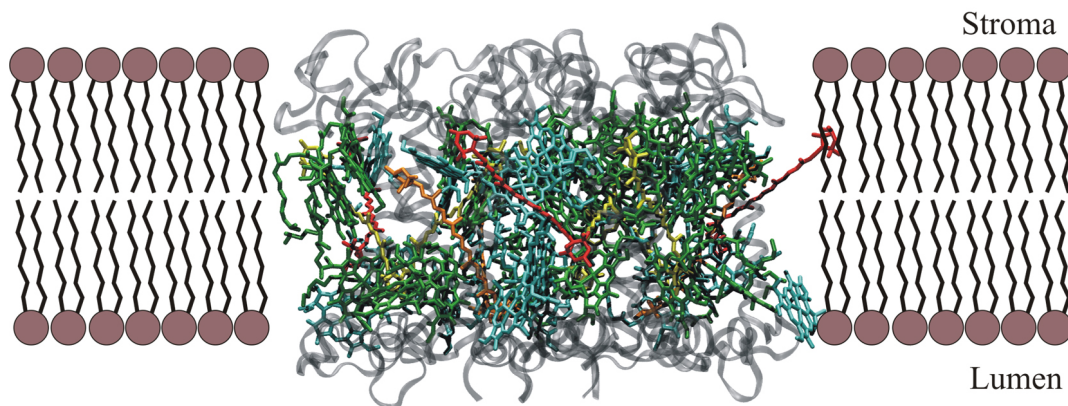


Abb. 9: Einbettung des LHCII-Proteins in die Thylakoidmembran nach Daten von Standfuss *et al.*^[22] - grün: Chl *a*, türkis: Chl *b*, gelb: Lutein, orange: Xanthophyllzyklus-Carotinoid, rot: Neoxanthin.

Dabei ergab sich eine Anzahl von 14 Chlorophyllen (acht Chlorophyll *a*, sechs Chlorophyll *b*) und vier Carotinoiden (zwei Lutein, ein Neoxanthin, ein Xanthophyllzyklus-Carotinoid) pro Monomer (s. Abb. 10). Diese Pigmente sind an fünf Helices gebunden, von denen drei die Thylakoidmembran durchspannen, wodurch das normalerweise gebundene Xanthophyllzyklus-Carotinoid Vio in das Lumen freigesetzt werden kann.

Hier kommt es je nach Lichtverhältnissen zu enzymatischen Umwandlungen im Rahmen des Xanthophyllzyklus (s. Kapitel 2.5.2) und anschließender Wiedereinlagerung des gebildeten Zeas in den LHCII. Die Bedeutung dieses Prozesses wird später näher erläutert.

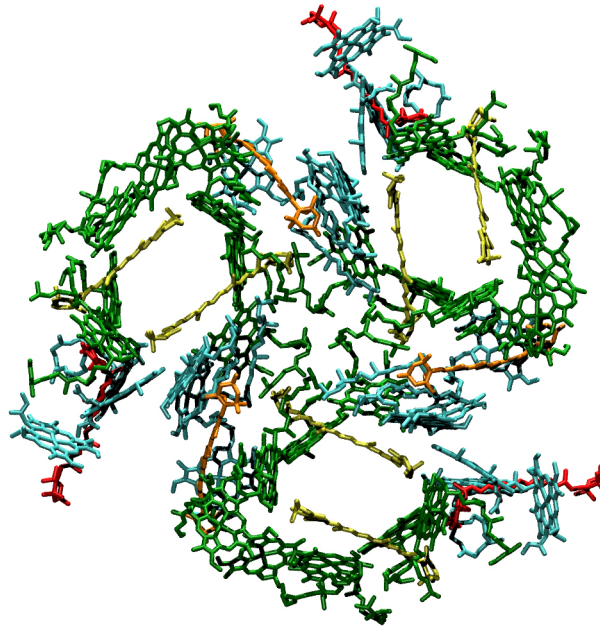


Abb. 10: Draufsicht auf die Lichtsammelpigmente eines LHCII-Trimers nach Daten von Standfuss *et al.* - grün: Chl *a*, türkis: Chl *b*, gelb: Lutein, orange: Xanthophyllzyklus-Carotinoid, rot: Neoxanthin.

Da LHCII einen Großteil der Xanthophyllzyklus-Carotinoide bindet, die einen klar bewiesenen Zusammenhang mit dem NPQ-Prozess besitzen,^[26] besteht die Vermutung, dass LHCII selbst der Ort ist, an dem es zum *Quenchen* überschüssiger Energie kommt.^[22, 27, 28]

2.3.2.2 Kleinere chlorophyllbindende Proteine (CP24, CP26, CP29)

Außer den LHCII-Komplexen befinden sich noch weitere chlorophyllbindende Proteine in der Peripherie des PSII-Superkomplexes. Ihre Namen CP24, CP26 und CP29 leiten sich aus ihren über Gelelektrophorese bestimmten Massen (in kDa) ab.^[26] Ihre Lage im Superkomplex konnte über Messungen mittels Elektronenmikroskopie bestimmt werden^[21, 29-31] (s. Abb. 8). Im Gegensatz zum LHCII existiert jedoch von diesen so genannten *minor complexes* noch keine aufgelöste Röntgenstruktur. Da ihre Gen-Sequenz jedoch eine hohe Ähnlichkeit zu der von LHCII aufweist, können Homologiebetrachtungen helfen, einen Einblick in ihre Struktur zu bekommen.^[32] Ein Beispiel für ein Ergebnis solcher Überlegungen ist in Abb. 11 dargestellt. Ebenso wie im LHCII-Monomer durchspannen drei Helices die Thylakoidmembran und auch die möglichen Positionen von Pigmenten konnten lokalisiert werden. Des Weiteren konnten über HPLC-Analysen die in ihnen vorkommenden Pigmente bestimmt werden,^[33] so dass es insgesamt möglich wird, Aussagen über ihre Funktion zu treffen, die neben dem Lichtsammeln auch eine Mitwirkung am NPQ-Prozess sein könnte.

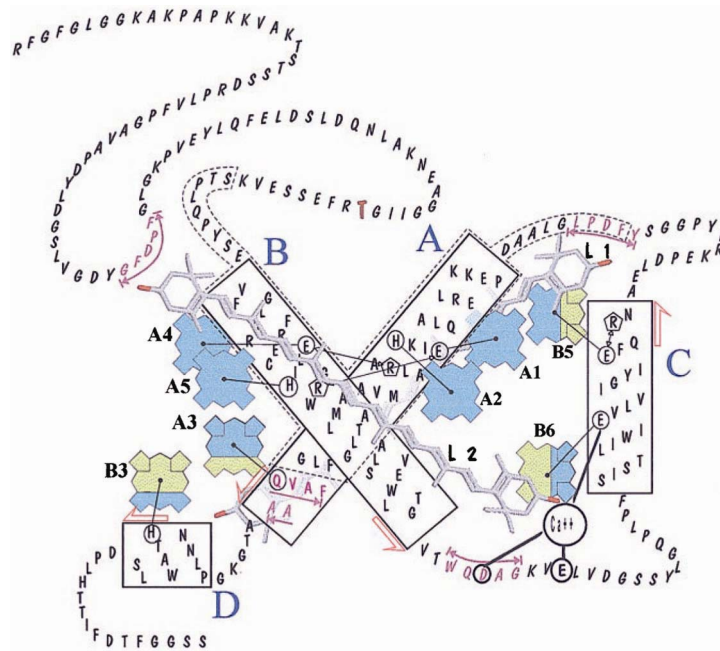


Abb. 11: Über Homologie-Betrachtungen postulierte Struktur von CP29.^[32]

Die Komplexe binden etwa 15 % der Chlorophylle im PSII-Superkomplex, so dass geschlossen werden kann, dass ihr Beitrag zum Lichtsammeln kleiner als der des LHCII ist. Die Komplexe enthalten sowohl Chlorophyll *a*- als auch Chlorophyll *b*-Pigmente, wobei ihre Gesamtanzahl von acht (CP29) über neun (CP26) zu zehn (CP24) reicht. Des Weiteren sind in ihnen etwa zwei Carotinoide gebunden, wobei Lutein, Neoxanthin, Vio und Zea festgestellt werden konnten.^[33] Trotz der geringeren Zahl der in ihnen gebundenen Pigmente könnten sie zu Regulationsprozessen unter hohen Lichtintensitäten beitragen, wobei durch die noch fehlenden Kristallstrukturen nur schwer eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die in ihnen gebundene Pigmente zum *Quenchen* führen können. Jedoch gibt es bereits einige Hinweise auf eine direkte Funktion als *Quencher*.^[23, 34, 35]

2.3.2.3 Das Protein PsbS

Ein weiteres wichtiges an der Lichtreaktion beteiligtes Protein ist die als PsbS bezeichnete 22 kDa Subeinheit^[36], welche ebenfalls im PSII-Superkomplex oder in seiner Nähe lokalisiert ist.^[4] Trotz vielfacher Versuche konnte die genaue Lage jedoch noch nicht bestimmt werden^[29, 31, 37], so dass Aussagen zu der Funktion des Proteins mit Schwierigkeiten behaftet sind. PsbS konnte als Mitglied der LHC-Superfamilie identifiziert werden^[38, 39], wobei die genaue Position innerhalb der Familie noch unklar ist. Trotz seiner strukturellen Nähe zu den anderen Lichtsammelantennen besitzt es einige Besonderheiten. So weist es beispielsweise vier anstatt drei transmembraner Helices auf^[40] (s. Abb. 11 und Abb. 12) und ist im Gegensatz zu den

verwandten Strukturen auch in Abwesenheit von Chlorophyllen stabil.^[41] Umstritten ist nach wie vor, ob PsbS in der Lage ist, Pigmente zu binden. Während von einigen Forschungsgruppen eine Bindung von Pigmenten in PsbS festgestellt werden konnte^[42], konnten andere nur Hinweise auf eine Wechselwirkung von PsbS mit Zea *in vitro* feststellen.^[43, 44]

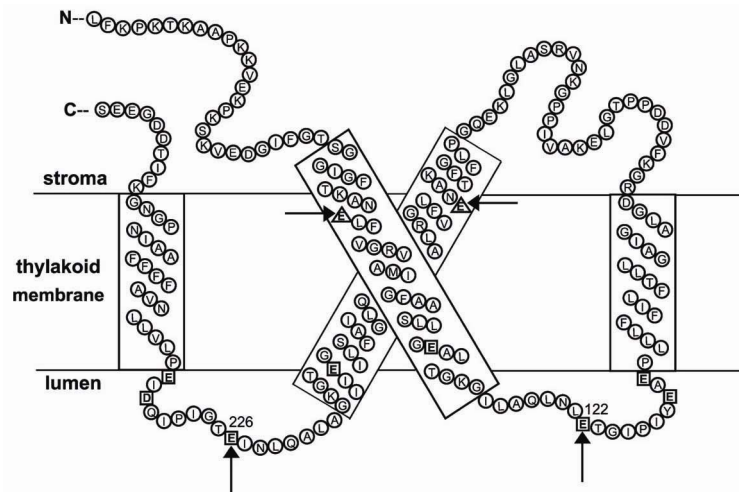


Abb. 12: Topologisches Modell von PsbS.^[4] Die horizontalen Pfeile markieren Glutamate, die in LHCI als Bindungsstellen für Chlorophylle dienen. Die senkrechten Pfeile markieren Glutamate, die essenziell für bestimmte *Quenching*-Prozesse sind.

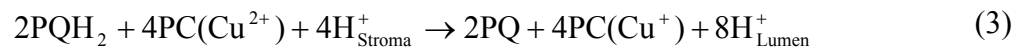
Aufgrund der geschilderten Ungewissheiten sind genaue Abschätzungen über die Funktion von PsbS schwierig. Jedoch konnte eindeutig gezeigt werden, dass das Protein einen wichtigen Beitrag zur Photoprotektion leistet, da die Fähigkeit zum *Quenchen* in genetisch veränderten Pflanzenmutanten ohne PsbS stark herabgesetzt ist.^[45]

Abschließend ist zu bemerken, dass die Entdeckung des Proteins und seiner Eigenschaften zwar zu einem großen Fortschritt zum Verständnis des NPQ-Prozesses geführt hat. Jedoch bleibt die zentrale Frage noch ungeklärt, nämlich ob PsbS selber als *Quencher* wirkt, indem es Pigmente bindet, die unter bestimmten Bedingungen ein *Quenching*-Zentren bilden. Es könnte auch als Katalysator dienen und Konformationsänderungen in anderen LHCs induzieren und somit zur Ausbildung von *Quenching*-Zentren beitragen.^[46]

2.3.3 Cytochrom *b₆f*

Bei dem Cytochrom *b₆f*-Komplex handelt es sich um ein Protein, das zwischen den beiden Photosystemen lokalisiert ist. Die Aufgabe dieses Komplexes besteht in dem Elektronentransport vom PSII zum PSI. Dazu katalysiert es die Reduktion von Plastocyanin, einem kleinen

Kupferprotein, durch das im PSII gebildete Plastochinol unter Bildung von Plastochinon und unter Abgabe von Protonen^[12]:



Es findet also ein Übergang von einem Zwei-Elektronen- auf einen Ein-Elektronen-Transporter statt. Anhand der Reaktionsgleichung kann man zudem sehen, dass das Protein zum weiteren Aufbau des Protonengradienten beiträgt, da die vom Plastochinol abgegebenen Protonen ins Lumen freigesetzt werden. Das reduzierte Plastocyanin ist löslich und transportiert das Elektron zum Reaktionszentrum vom PSI.^[18]

2.3.4 Photosystem I

Das PSI ist ein aus 14 Polypeptidketten bestehendes Protein, das 96 Moleküle Chlorophyll *a* und 22 Moleküle β -Carotin enthält und in der Natur als Trimer vorkommt.^[47] Ebenso wie im PSII besitzt das PSI im Zentrum ein *Special Pair*. Dieses besitzt sein Absorptionsmaximum jedoch bei 700 nm und wird daher als P700 bezeichnet (s. Abb. 13).^[14]

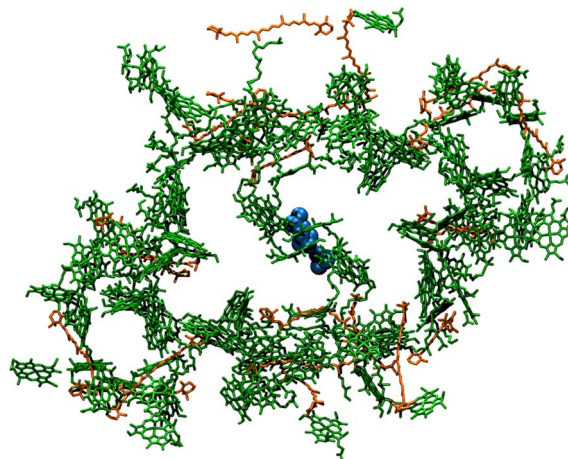
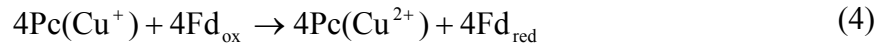


Abb. 13: Draufsicht auf die Lichtsammelpigmente eines PSI-Monomers. Die Fe-S-Cluster liegen direkt unter dem *special pair*. Erstellt aus Daten von Jordan *et al.*^[47] - grün: Chl *a*, orange: β -Carotin, blau: Fe-S-Cluster.

Nach Absorption von Licht erfolgt ebenso wie im PSII ein Energietransfer zum Reaktionszentrum und damit eine Anregung des *Special Pair*. Darauf wird die Ladung getrennt und das Elektron wird über ein Chlorophyll-Molekül, ein Chinon und drei 4Fe-4S-Cluster (s. Abb. 14) auf das Protein Ferredoxin übertragen.^[15] Die im *Special Pair* entstandene positive Ladung

wird durch das in dem Cytochrom *b₆f* erzeugte reduzierte Plastocyanin ausgeglichen, so dass sich folgende Gesamtgleichung ergibt:



Die nun in Ferredoxin gespeicherte Energie kann jedoch noch nicht im Rahmen der biochemischen Synthese verwendet werden. Das Ferredoxin gibt daher in einem weiteren Schritt sein Elektron an das Molekül NADP^+ ab, welcher durch das Protein Ferredoxin- NADP^+ -Reduktase katalysiert wird. Unter Aufnahme von einem Proton aus dem Stroma wird das starke Reduktionsmittel NADPH gebildet, das in den Dunkelreaktionen benötigt wird. Da die Protonenaufnahme im Stroma erfolgt, erhöht sich der Protonengradient erneut.^[14]



Aus den bisherigen Reaktionen ergibt sich folgende Bilanz der Lichtreaktion:

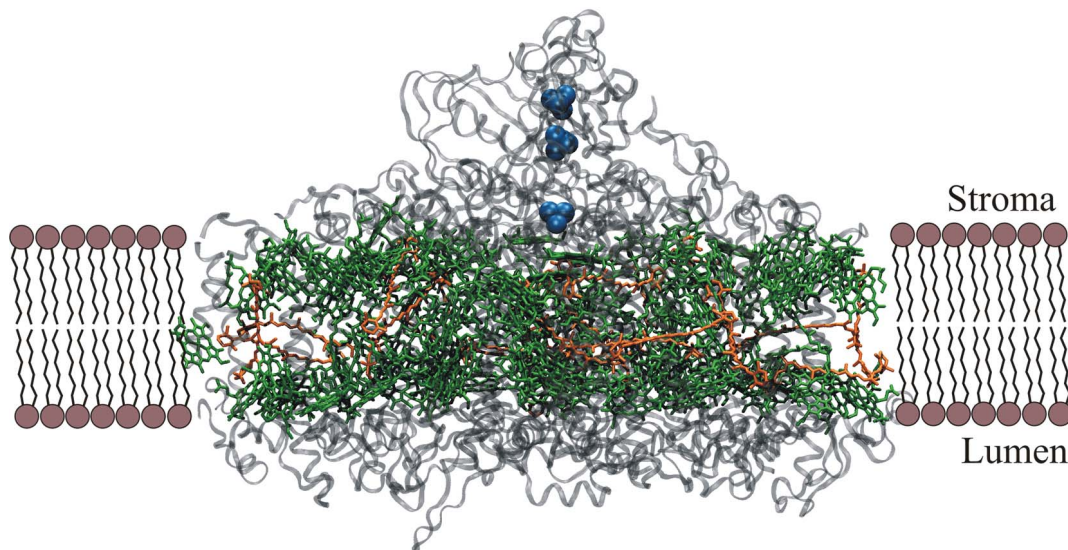
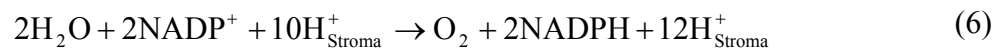
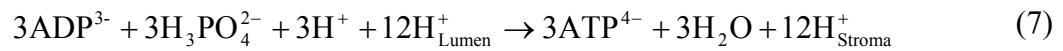


Abb. 14: Einbettung eines PSI-Monomers in die Thylakoidmembran. Erstellt aus Daten von Jordan *et al.*^[47] - grün: Chl *a*, orange: β -Carotin, grau: Polypeptid, blau: Fe-S-Cluster.

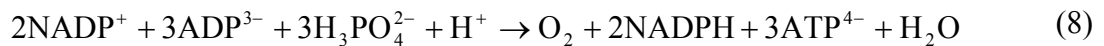
2.3.5 ATP-Synthase

Im Laufe der Lichtreaktion wurde über die Thylakoidmembran ein Protonengradient aufgebaut. Die in diesem Gradienten gespeicherte protonenmotorische Kraft wird von der ATP-

Synthese dazu verwendet, aus dem Molekül ADP (Adenosindiphosphat) das Molekül ATP (Adenosintriphosphat) zu erzeugen, das in den Dunkelreaktionen als Energieträger dient.



Kombiniert man die Reaktionsgleichungen (6) und (7), kommt man auf folgende Gesamtreaktionsgleichung der Lichtreaktion:



2.4 Dunkelreaktionen

Mit der Nutzung der Energie von acht Photonen wurden in den Lichtreaktionen zwei Moleküle NADPH, ein Sauerstoffmolekül und drei Moleküle ATP erzeugt. Die eigentlichen Schritte der Biosynthese von Hexosen erfolgen unter Verwendung der erzeugten Verbindungen in den so genannten Dunkelreaktionen. ATP und NADPH befinden sich im Stroma und bewirken die Reaktion von Kohlendioxid zu Hexosen. Dieser Stoffwechselweg wird nach seinem Entdecker auch als Calvin-Zyklus bezeichnet (s. Abb. 15).^[12]

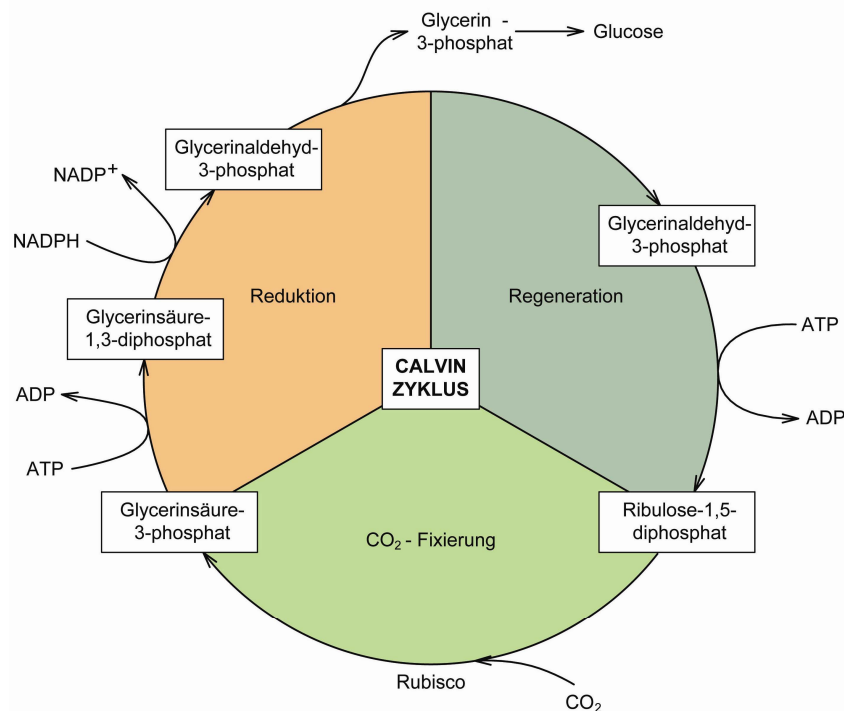
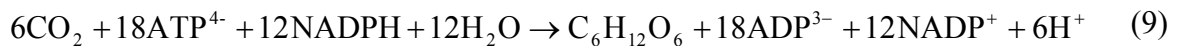


Abb. 15: Dunkelreaktion zur CO₂-Fixierung unter Verwendung der in der Lichtreaktion erzeugten Verbindungen ATP und NADPH (frei nach ^[12]).

Das NADPH ist als starkes Reduktionsmittel zur Reduktion des Kohlenstoffatoms des Kohlendioxids in der Lage, wobei das entstehende NADP^+ dem Photosynthese-Kreislauf wieder zur Verfügung steht. Da diese Reaktion endotherm ist, wird das ATP als Energiequelle benötigt. Die Umsetzung erfolgt über die Pentose Ribulose-5-Phosphat, welche am Ende des Zyklus wieder in ihrem Ursprungszustand vorliegt.^[18] Die Gesamtreaktionsgleichung des Calvin-Zyklus lautet:



Durch Kombination der Reaktionsgleichung der Lichtreaktion und der Reaktionsgleichung der Dunkelreaktion ergibt sich die allgemeine Gleichung der Photosynthese (s. Gleichung (1)).

2.5 Struktur und Spektroskopie der Lichtsammelpigmente

Der wichtigste Schritt der Photosynthese besteht in der Absorption von Licht, da ohne die Aufnahme von Energie keine chemischen Synthesen betrieben werden können. Zu diesem Zweck bedienen sich Pflanzen und andere Photosynthese betreibende Organismen der Lichtsammelpigmente. In Pflanzen kommt eine Vielzahl von Lichtsammelpigmenten vor, auf die in diesem Kapitel eingegangen werden soll. Die im vorigen Kapitel dargestellten Proteine fixieren die unterschiedlichen Pigmente, so dass sich ein optimaler Absorptionsquerschnitt ergibt und eine schnelle und verlustfreie Weiterleitung der Energie zu den *Special Pairs* erfolgen kann. Den Pigmenten kommen neben der Funktion des Lichtsammelns auch weitere Aufgaben zu, die im Folgenden erläutert werden sollen.

2.5.1 Chlorophylle

Die Chlorophylle bilden die erste Klasse von Lichtsammelpigmenten, welche den Pflanzen ihre charakteristische grüne Färbung verleihen. Bei ihnen handelt es sich um quadratisch planar aufgebaute Komplexstrukturen mit einer Seitenlänge von etwa 10 Å mit Mg^{2+} als Zentral-Ion (s. Abb. 16). An dieses Zentral-Ion sind vier Stickstoffatome koordiniert, die ihrerseits Teile von Pyrrol-Ringen sind, die über Methingruppen miteinander verbunden sind. Dieser Tetrapyrrol-Ring wird auch als Porphyrin bezeichnet. Zusätzlich besitzen sie eine Kohlenwasserstoff-Kette an der 17-Position sowie einen weiteren Ring an dem C-Pyrrol.^[13]

Insgesamt ergibt sich ein großes delokalisiertes π -Elektronensystem, das die spektroskopischen Eigenschaften der Chlorophylle bestimmt.

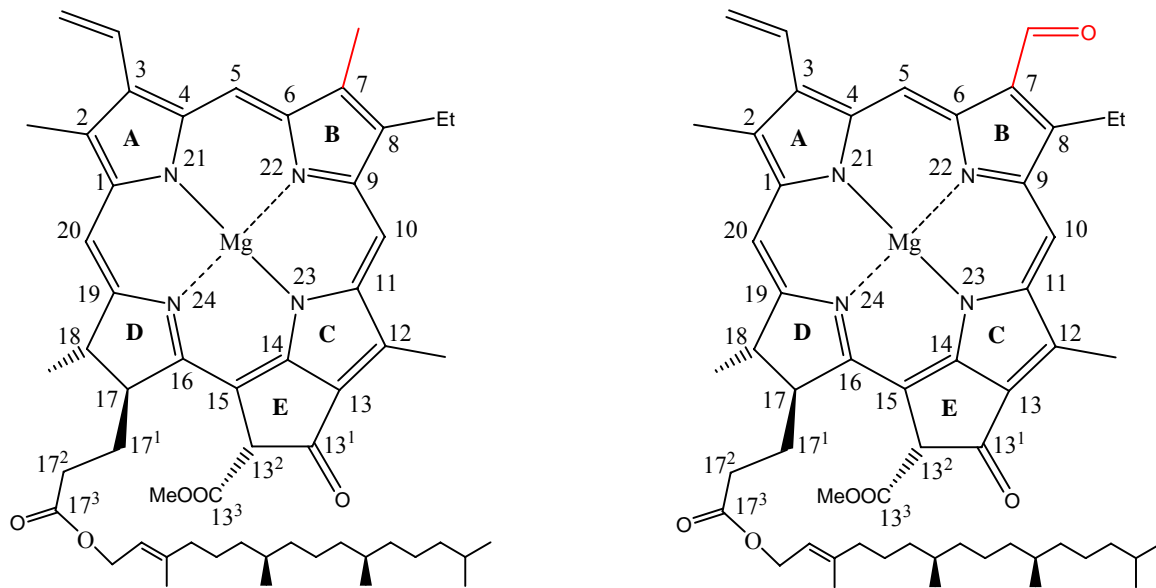


Abb. 16: Strukturformeln von Chl *a* (links) und Chl *b* (rechts). Die beiden Strukturen sind bis auf den unterschiedlichen Substituenten in der C7-Position des Pyrrolrings identisch.^[48]

Die häufigsten in Pflanzen vorkommenden Chlorophyllarten werden der Reihenfolge ihrer Entdeckung nach als Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b* bezeichnet. Sie kommen in nahezu allen eukaryotischen Organismen vor und bewirken den Hauptteil der Lichtabsorption in höheren Pflanzen.^[12] Ihre chemische Struktur ist nahezu gleich. Der einzige Unterschied besteht in der C7-Position des Porphyrin-Ringes, welche im Falle des Chlorophyll *a* mit einer Methyl-Gruppe und im Falle des Chlorophyll *b* mit einer Acetyl-Gruppe substituiert ist. Es resultieren leicht voneinander abweichende Absorptionsspektren, die so in der Lage sind, einen größeren Wellenlängenbereich zum Lichtsammeln abzudecken (s. Abb. 17). Dabei ist anzumerken, dass Chlorophyll *b* bis auf wenige Ausnahmen nur in Antennenkomplexen vorliegt, während in den Kernkomplexen Chlorophyll *a* zum Lichtsammeln verwendet wird.^[13] Des Weiteren kommen in manchen Eukaryoten die Chlorophylle *c* und *d* vor, die jedoch im Vergleich zu Chlorophyll *a* und *b* nicht in höheren Pflanzen, sondern nur in Algen und einigen Cyanobakterien identifiziert werden konnten.

Alle Chlorophylle besitzen zwei Hauptabsorptionsbereiche, von denen einer im blauen und der zweite im roten Spektralbereich liegt. Durch das Fehlen von Absorptionsbanden im grünen Spektralbereich ergibt sich ihre grüne bzw. blau-grüne Färbung. Die Spektren der Chlorophylle werden über die beiden höchsten besetzten π -Molekülorbitale (HOMO) und die beiden niedrigsten unbesetzten π -Molekülorbitale (LUMO) beschrieben. Die beiden Übergän-

ge niedriger Energie werden als Q_x - und Q_y - und die Übergänge höherer Energie als Soret-Banden bezeichnet (s. Abb. 17).^[13]

Durch einen *Stokes-Shift* sind die Fluoreszenzspektren der Chlorophylle zu längeren Wellenlängen verschoben und durch die Ähnlichkeit des Grund- und angeregten Zustandes besitzt es eine zum Absorptionsspektrum spiegelbildliche Form.

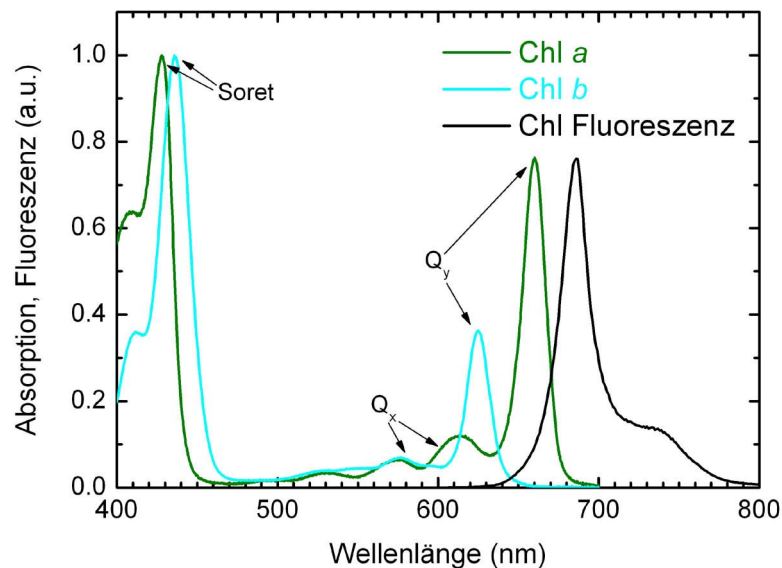


Abb. 17: Absorptionsspektren von Chl *a* (dunkelgrün) und Chl *b* (türkis) mit Kennzeichnung der Soret-, Q_x - und Q_y -Absorptionsbanden sowie das Fluoreszenzspektrum von LHCII in wässriger Lösung (schwarz).

Die zweite Gruppe von Chlorophyllen sind die in photosynthetisch aktiven Bakterien vorkommenden Bakteriochlorophylle. Sie zeichnen sich durch eine größere Variation von Substituenten am Porphyrin sowie einen reduzierten C-Ring aus, wodurch die Größe des delokalisierten π -Elektronensystems stärker variiert und somit andere Absorptionsbereiche resultieren.^[12] Da die Bakteriochlorophylle jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, soll hier nicht weiter auf sie eingegangen werden.

2.5.2 Carotinoide

Eine weitere wichtige Gruppe der Lichtsammelpigmente sind die Carotinoide. Im Gegensatz zu den Chlorophyllen existieren sie in wesentlich mehr Erscheinungsformen. Es sind mehrere hundert unterschiedliche Strukturen bekannt, die jedoch charakteristische strukturelle Gemeinsamkeiten besitzen. So bestehen sie aus einer meist linearen, ausgedehnten Kohlenwasserstoffkette mit Ringstrukturen an ihren Enden. Durch eine unterschiedliche Anzahl an konjugierten Doppelbindungen resultieren unterschiedlich große π -Elektronensysteme, die unter-

schiedliche spektroskopische Eigenschaften hervorrufen. Viele Carotinoide liegen auch als oxidierte Derivate vor, mit Sauerstoffatomen in Form von Hydroxyl- und Epoxidgruppen. Diese oxidierten Carotinoide werden auch als Xanthophylle bezeichnet, während die nicht oxidierten unter dem Namen Carotine zusammengefasst werden.^[14]

Durch die große Anzahl von in der Natur existierender Carotinoide soll sich die Beschreibung auf diejenigen beschränken, die in den Lichtsammelsystemen von höheren Pflanzen zur Photosynthese gebunden sind. Das einzige Carotinoid, das in PSII und PSI vorkommt, ist β -Carotin, während in den peripheren Lichtsammelantennen LHCII, CP24, CP26 und CP29 Lutein, Neoxanthin und die Xanthophyll-Zyklus-Carotinoide Violaxanthin und Zeaxanthin als Lichtsammelpigmente fungieren. Der Ursprung der genannten Carotinoide geht auf Biosynthesen zurück, die ausgehend von Isopren als einfachem Baustein zunächst immer längere Ketten bilden, bis das Zwischenprodukt Phytoen erzeugt ist. Da Phytoen durch isolierte Doppelbindungen noch farblos ist und somit kein sichtbares Licht absorbieren kann, wird durch Dehydrierungsreaktionen das konjugierte Doppelbindungssystem vergrößert. Es entsteht das Carotin Lycopin, von dem aus zwei unterschiedliche Synthesewege beschrritten werden können (s. Abb. 18).

Im ersten Zweig der weiteren Synthese wird über zwei Zyklisierungen zunächst δ - und dann α -Carotin und über zwei Oxidationen das Carotinoid Zeinoxanthin und schließlich Lutein gebildet. Im zweiten Synthese-Zweig erfolgen ebenfalls zuerst zwei Zyklisierungen zur Synthese von β -Carotin, aus dem anschließend Violaxanthin, Zeaxanthin und über weitere Schritte trans-Neoxanthin gebildet werden.^[49]

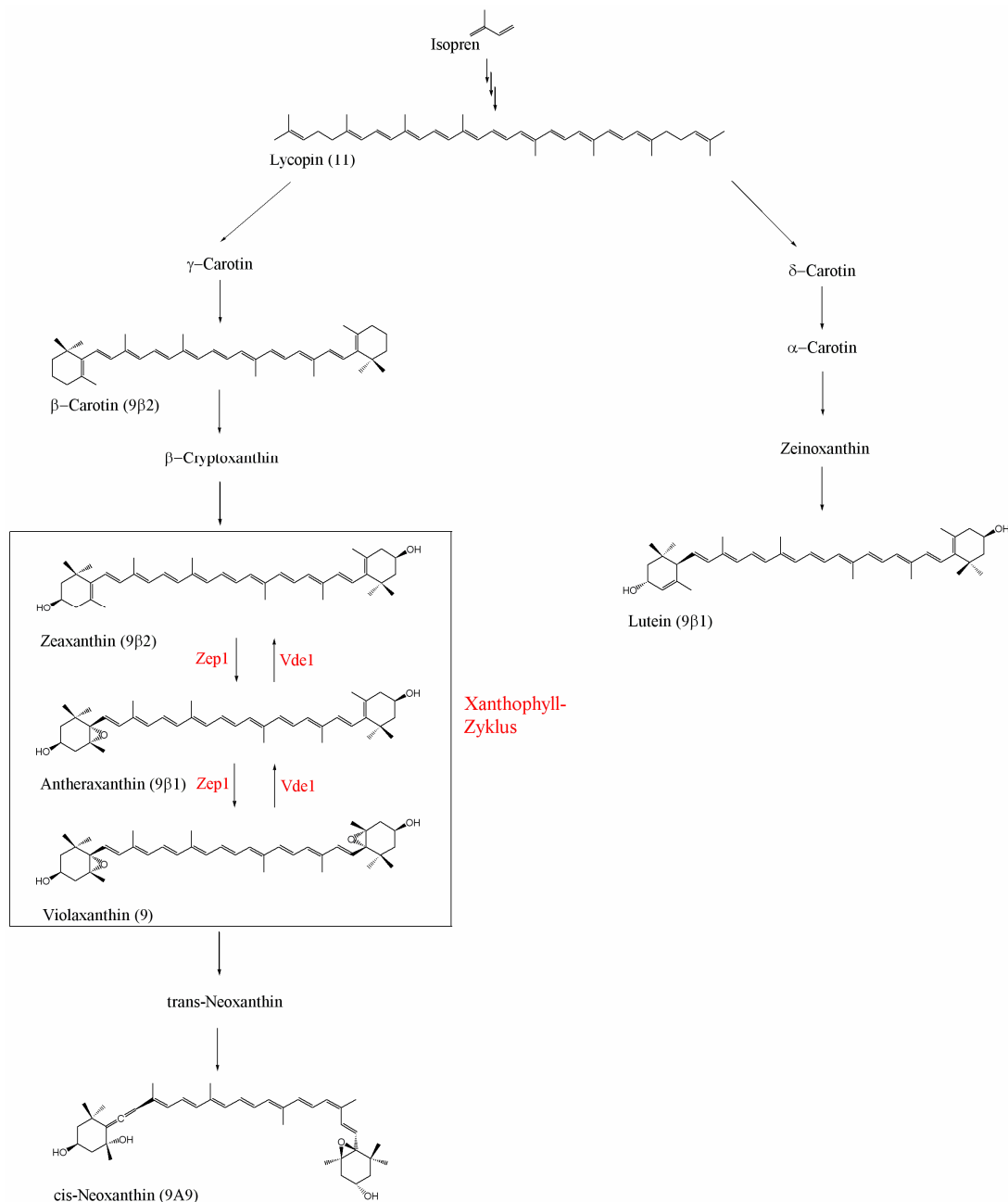


Abb. 18: Biosynthese der Carotinoide am Beispiel von *A. thaliana* (frei nach ^[49]). Die Länge der konjugierten Doppelbindungen ist in Klammern angegeben. Der über die Enzyme Zea-Epoxidase und Vio-Deepoxidase ablaufende Xanthophyllzyklus mit den am NPQ-Prozess beteiligten Xanthophyllen ist gesondert hervorgehoben.

Die spektroskopischen Eigenschaften von Carotinoiden werden maßgeblich durch ihre konjugierten π -Elektronensysteme hervorgerufen. Die Struktur kann vereinfachend als symmetrisch betrachtet werden, wodurch sich eine Zugehörigkeit zur C_{2h} -Punktgruppe ergibt.^[50] Daher besitzen sowohl der S_0 -Grundzustand als auch der S_1 -angeregte Zustand A_g^- -Symmetrie.^[10, 11, 51, 52] Da Ein-Photonenübergänge nach den Auswahlregeln unter Umkehrung der Parität erfolgen müssen, ist keine Absorption oder Fluoreszenz für den S_0 - S_1 -Übergang möglich. Zur direkten Untersuchung des S_1 -Niveaus ist somit klassische Spektroskopie nicht geeignet.

Vielmehr muss die Anregung mittels TPE erfolgen^[53, 54], da für diese nicht-lineare Untersuchungsmethode umgekehrte Auswahlregeln gelten. Ein weiterer Vorteil in der Verwendung von TPE liegt in der selektiven Anregung von Carotinoiden, die bei OPE nicht gegeben ist (s. Kapitel 4.1).

Erst der zweite angeregte Zustand (S_2) besitzt mit seiner B_u^+ -Symmetrie umgekehrte Parität, so dass dieser Übergang mittels Ein-Photonen-Prozessen bevölkert werden kann. Dieser Übergang ist auch für die Absorptionsbanden zwischen 400 und 500 nm verantwortlich (s. Abb. 19), wodurch die Carotinoide ihre rötliche Färbung erhalten. Insgesamt tragen die Carotinoide mit etwa 20-30 % zum Lichtsammeln bei, indem sie nach Anregung ihre Energie zum Reaktionszentrum weitergeben. Für die Pflanzen ist insbesondere auch die Vergrößerung des zum Lichtsammeln nutzbaren Wellenlängenbereiches von Bedeutung.

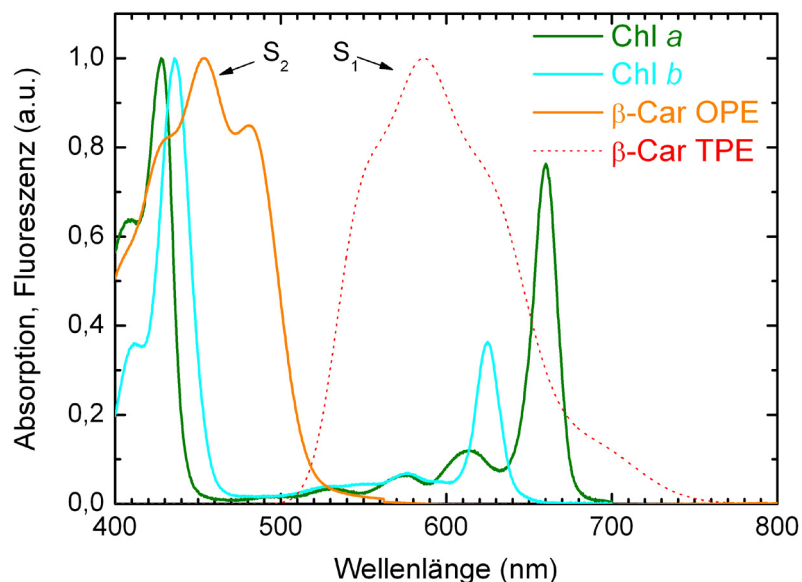


Abb. 19: Ein-Photonen-Absorptionsspektrum von β -Carotin in n-Oktan (orange) sowie Zweiphotonen-Anregungsspektrum (rot).^[54] Zum Vergleich der Lage der Absorptionsmaxima sind zusätzlich die Chlorophyll-Absorptionsspektren aus Abb. 17 mit dargestellt.

Obwohl Carotinoide als Lichtsammelpigmente zur Absorption von Licht und damit Energie dienen, wirken sie auch am NPQ-Prozess mit und können damit den Energietransfer an das *Special Pair* regulieren. Unter hohen Lichtintensitäten schützen sie die Pflanzen, indem sie als *Quencher* wirken, anstatt die von ihnen aufgenommene Energie an die Chlorophylle zu übertragen (s. Abb. 20). Das heißt, dass der Energiefluss umgekehrt und dadurch überschüssige Energie in Form von Wärme abgegeben wird.

Im Kapitel 2.3 wurde der Aufbau eines pH-Gradienten über die Thylakoidmembran vorgestellt, der einsetzt, sobald die Lichtreaktionen durch Absorption von Strahlung beginnen.

Dieser pH-Gradient triggert die beiden Enzyme Zeaxanthin-Epoxidase (Zep1) und Viola-xanthin-Deepoxidase (Vde1), die für die Umwandlung der am Xanthophyllzyklus (s. Abb. 18) beteiligten Carotinoide verantwortlich sind. Während im dunkeladaptierten Zustand Vio im LHCII angereichert ist, erfolgt unter zunehmender Lichteinstrahlung die schrittweise Deepoxidierung zu Zea über die Zwischenstufe Antheraxanthin.

Dabei wird zum einen die Länge des konjugierten π -Elektronensystems um zwei Doppelbindungen vergrößert. Da durch eine Ausdehnung von Molekülorbitalen ihre Energie abgesenkt wird, wurde postuliert, dass das S_1 -Niveau von Zea so weit absinken könnte, dass Zea direkt als *Quencher* wirken könnte. Diese Art des direkten Energie-*Quenchens* durch Bildung von Zea wird auch als *Molecular Gear Shift Model* bezeichnet.^[8]

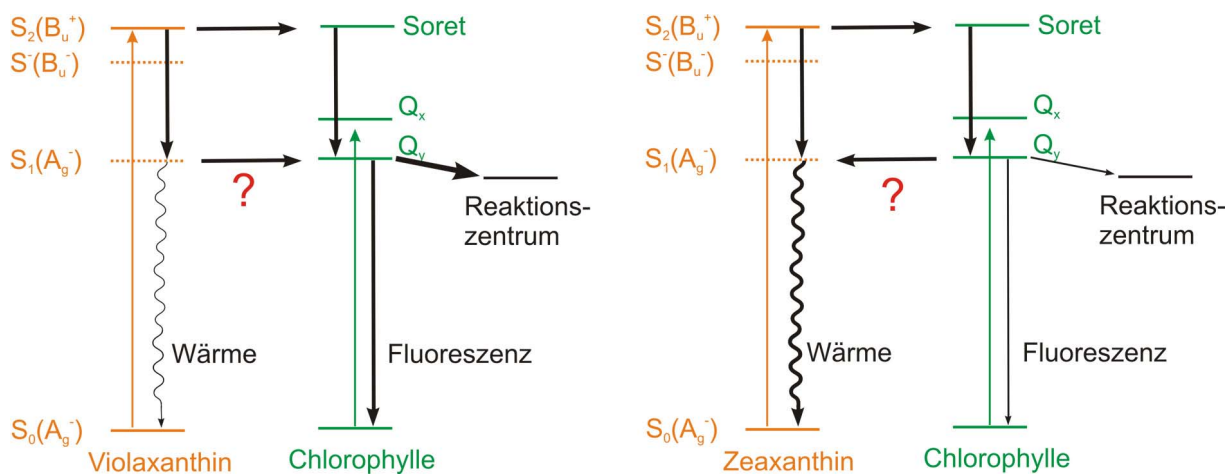


Abb. 20: Energetische Lage der Energieniveaus von Chlorophyll und β -Carotin. **links:** Im dunkeladaptierten Zustand beteiligen sich die Carotinoide am Lichtsammeln. **rechts:** Im helladaptierten Zustand tragen Carotinoide zum *Quenchen* überschüssiger Energie bei (frei nach ^[55]).

Zum anderen resultieren aus der Umwandlung auch sterische Unterschiede, die sich auf die Konformation der Lichtsammelantennen auswirken könnten. Dabei wurde postuliert, dass durch diese Konformationsänderungen *Quenching*-Zentren gebildet werden könnten, die zunächst zur Energieaufnahme und letztlich zur Umwandlung dieser Energie in Wärme führen könnten.^[28, 56] Die an den *Quenching*-Zentren beteiligten Moleküle konnten jedoch noch nicht eindeutig bestimmt werden. Es wurden verschiedene Möglichkeiten vorgeschlagen, in welchem Lichtsammelprotein das *Quenching*-Zentrum liegen könnte (s. Kapitel 2.3.2).

Die genaue Wirkungsweise der Umwandlung von Vio zu Zea im Rahmen des NPQ-Prozesses konnte noch nicht aufgeklärt werden und ist nach wie vor ein stark untersuchtes Forschungsgebiet. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Zea für diesen Prozess eine große Wichtigkeit besitzt.^[57-60]

Neben den beiden Aufgaben des Lichtsammelns und der Mitwirkung an der Regulation der Energieübertragung ans Reaktionszentrum übernehmen Carotinoide auch eine Rolle zum Schutz des Photosyntheseapparates vor gefährlichen Nebenprodukten, die bei der Photosynthese entstehen. So wird durch Lichteinstrahlung Triplett-Chlorophyll (^3Chl) erzeugt, welches seine Energie an normalen Triplett-Sauerstoff ($^3\text{O}_2$) abgeben kann. Dabei wird reaktiver Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) gebildet, welcher durch sein hohes Oxidationsvermögen die Bestandteile des Photosystems oxidieren und damit zerstören kann (s. Abb. 21). Durch ihre speziellen spektroskopischen Eigenschaften können die Carotinoide jedoch diese Energie über ihren niedrig liegenden Triplettzustand aufnehmen und als Wärme abgeben. Dabei kann die Aufnahme der Energie zum einen direkt vom ^3Chl erfolgen und zum anderen können die Carotinoide auch bereits gebildeten Singulett-Sauerstoff wieder abbauen. Durch diese Umwandlungsprozesse kann der Photosyntheseapparat der Pflanze vor Beschädigungen bewahrt werden.^[26]

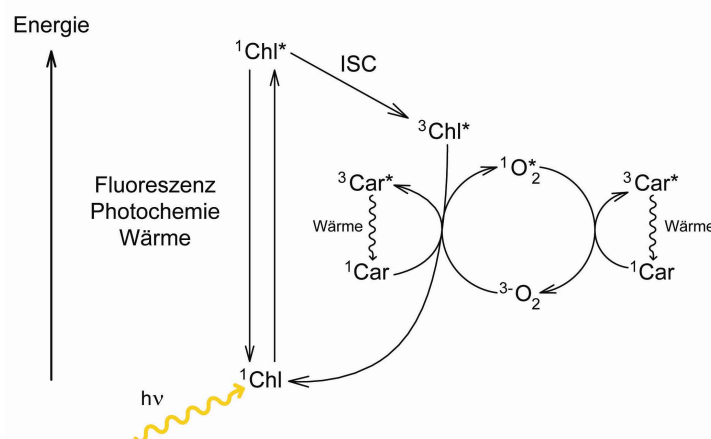


Abb. 21: Schematische Darstellung der durch die Carotinoide erfolgenden Photoprotektion. (frei nach^[57])

2.6 Komponenten des nicht-photochemischen *Quenchings*

Wie bereits erläutert, wird die von den Pigmenten absorbierte Energie zur Betreibung der photochemischen Prozesse verwendet. Dieser Vorgang wird auch als photochemisches *Quenchen* (qP) bezeichnet, da die Energie durch das Reaktionszentrum abgefangen wird. Unter hohen Lichtintensitäten muss es jedoch zum so genannten nicht-photochemischen *Quenchen* (qN bzw. NPQ) kommen, bei dem die überschüssige Energie in Wärme umgewandelt wird, um das Reaktionszentrum zu schützen. Zur Erklärung des NPQ-Prozesses wurden verschiedene Theorien vorgestellt, wie die Energie gefahrlos abgeleitet werden könnte. Viele dieser Theorien basieren auf Erkenntnissen, die mittels Analyse der Fluoreszenz der Chlorophylle

gewonnen worden. Da sie mit einfachen, nicht-invasiven Methoden gemessen werden kann, hat sich die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz in den letzten Jahren zu einem Standardverfahren entwickelt. Sie liefert wertvolle Informationen über die Reaktion von Pflanzen auf sich verändernde Umwelteinflüsse und lässt somit Rückschlüsse auf die Funktionsweise des Photosyntheseapparates zu.^[61, 62]

Es handelt sich bei der Chlorophyll-Fluoreszenz gewissermaßen um einen Konkurrenzmechanismus zu qP und qN. Denn obwohl die Übertragung ins Reaktions- oder *Quenching*-Zentrum sehr schnell abläuft, werden stets etwa 0,6-3 % der absorbierten Energie als Fluoreszenz abgegeben.^[63] Durch die Konkurrenzsituation mindern sowohl qP als auch qN die Fluoreszenzausbeute, was auch als Fluoreszenz-Löschung (*Quenchen*) bezeichnet wird. Ein Anstieg von qP oder qN wird also durch einen Anstieg der Fluoreszenz-Löschung widerspiegelt.

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte nicht-photochemische *Quenchen* setzt sich als Summe von drei Komponenten zusammen, die unterschiedliche Kinetiken nach einer erfolgten Lichteinstrahlung aufweisen:

$$qN = qE + qT + qI \quad (10)$$

Das energieabhängige bzw. ΔpH -abhängige *Quenchen* qE stellt die Komponente mit der schnellsten Relaxationskinetik dar ($t_{0,5} \approx 1 \text{ min}$).^[64] Die Abkürzung NPQ wird häufig als Synonym für qE verwendet, wobei in diesem Kapitel eine klare Trennung und Erklärung der drei Komponenten erfolgen soll. Im Anschluss an dieses Kapitel wird ebenfalls vereinfachend von NPQ gesprochen werden. qE wird durch einen hohen pH-Gradienten über der Thylakoid-Membran hervorgerufen, der auftritt, sobald der Photosyntheseapparat hohen Lichtbedingungen ausgesetzt ist.^[64] Diese pH-Änderung ist in der Lage, sehr schnell auf die veränderten Rahmenbedingungen zu reagieren und die Mechanismen zu triggern, die die Pflanzen vor Photooxidation schützen. Die Prozesse, die durch den veränderten pH-Wert in Gang gesetzt werden, umfassen eventuelle Konformationsänderungen in den Lichtsammelantennen, die Inangangsetzung des Xanthophyllzyklus und ein Mitwirken von PsbS. Fällt der pH-Wert im Lumen unter einen bestimmten Wert, so wird durch den Xanthophyllzyklus Vio in Zea umgewandelt^[65], welches in vielen Experimenten eine starke Korrelation mit qE zeigte.^[1, 6, 57, 66] Konformationsänderungen der Antennenkomplexe werden auch immer wieder als mögliche Ursache für qE genannt, wobei unterschiedliche Mechanismen als Möglichkeiten vorgeschlagen werden.^[25, 28, 67, 68] Eine besonders große Rolle am qE-Prozess wird PsbS zugeschrieben, da Mutanten ohne dieses Protein stark verringerte *Quenching*-Fähigkeiten aufweisen.^[45]

Das *State-Transition Quenching* qT wirkt auf einer Zeitskala von etwa 5-10 min^[64] und spiegelt die Prozesse wider, die für die Regulation der Energieverteilung zwischen den Photosystemen sorgen. Sie erfolgen durch Phosphorylierung der Lichtsammelantennen, wodurch diese vom PSII getrennt werden. Da diese Komponente des qT jedoch nur unter schwachen Lichtverhältnissen eine Rolle spielt, kann sie im Folgenden vernachlässigt werden.^[69]

Das photoinhibitorische *Quenchen* (qI) hat die längste Relaxationskinetik der drei Komponenten ($t_0 \approx 30$ min).^[3] Es spielt erst bei sehr hohen Lichtintensitäten, die über einen längeren Zeitraum auf die Pflanze wirken, eine Rolle. Dabei kommt es zu einer partiellen Deaktivierung des D1-Proteins im PSII und damit einhergehender Verringerung von Kohlendioxid-Assimilation und Sauerstoffbildung.^[70]

2.7 Energietransfermechanismen

Die von den Lichtsammelpigmenten absorbierte Energie muss möglichst ohne Verluste an das Reaktionszentrum weitergeleitet werden, um genügend Energie für die Photosynthese bereitzustellen. Da alleine die am Rand liegenden Pigmente im PSII einen Abstand von mehr als 100 Å zum *Special Pair* haben und die Pigmente in den peripheren Lichtsammelkomplexen noch weiter entfernt liegen, benötigt die Pflanze einen Mechanismus zur Energieübertragung mit minimalen Verlusten. Eine direkte Übertragung der Energie von so weit voneinander entfernten Molekülen besitzt nicht die benötigte Effizienz, so dass die Energie in mehreren Schritten von Pigment zu Pigment bis zum *Special Pair* übertragen wird. Dieser Transfer muss in Zeitspannen ablaufen, die wesentlich kürzer sind als die Lebensdauer des angeregten Chlorophyll-Zustandes. Die Energie würde sonst in Wärme umgewandelt oder in Form von Fluoreszenz emittiert werden. Damit stünde die Energie nicht mehr für die Reaktionen im Rahmen der Biosynthese zur Verfügung.

In den Lichtsammelkomplexen findet der so genannte Energietransfer nach Förster statt (s. Kapitel 2.7.1). Dabei wird die Energie direkt auf Nachbarmoleküle übertragen. Diese Art der Energieübertragung unterscheidet sich grundlegend von dem trivialen Weg der Fluoreszenzemission des Donormoleküls und anschließender Absorption durch das Akzeptormolekül. Ein weiterer Energietransfermechanismus ist der Dexter-Energietransfer, welcher eine Rolle bei der Photoprotektion der Pflanzen spielt (s. Kapitel 2.7.2).

2.7.1 Förster-Energietransfer

Der Försterenergietransfer erfolgt durch coulombsche Wechselwirkungen zwischen den Übergängen von Donor und Akzeptor. Coulombsche Wechselwirkungen werden mit Hilfe von Formeln aus der Elektrostatik beschrieben. Die Übergangsdichte M wird oft vereinfachend als klassischer, oszillierender Übergangsdipol μ beschrieben.^[71]

Im Rahmen des Försterenergietransfers induziert dieser oszillierende Dipol in Nachbarmolekülen, die sich im Grundzustand befinden, ebenfalls eine Oszillation. Unter Resonanzbedingungen kann so die Energie von einem Molekül auf das nächste übertragen werden (s. Abb. 22). Dabei kehrt der Donor wieder in den Grundzustand zurück.

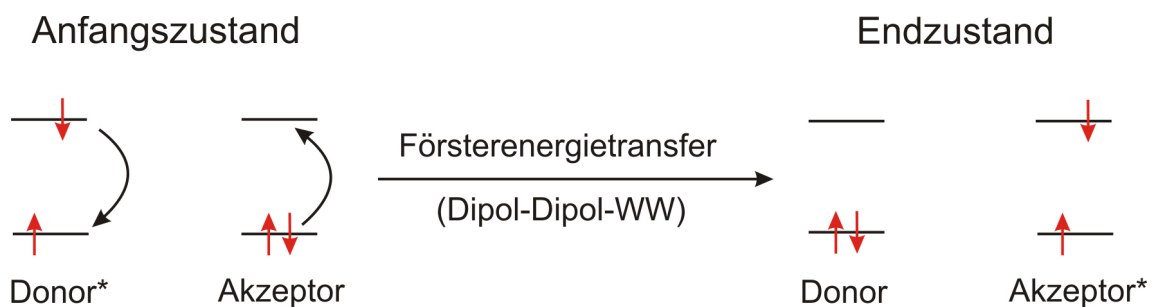


Abb. 22: Energieübertragung im Rahmen des Förster-Energietransfers.^[48]

Die Kopplung V zwischen zwei Übergangsdipolen ist proportional zu

$$V \propto \frac{|\mu_D| \cdot |\mu_A|}{R_{DA}^3} \quad (11)$$

mit μ_D und μ_A als Übergangsdipolen und R_{DA} als Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Die Rate des Energietransfers k_{ET} ist zu dem Quadrat der Kopplung proportional, so dass sich

$$k_{ET} \propto V^2 \propto \frac{|\mu_D|^2 \cdot |\mu_A|^2}{R_{DA}^6} \quad (12)$$

für die Energieübertragungsrate ergibt.^[72, 73] Damit ist die Energietransferrate umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstandes zwischen den beteiligten Molekülen.

Die Distanz, bei der der Försterenergietransfer mit einer Effizienz von 50 % abläuft, wird auch als Förster-Radius bezeichnet (s. Abb. 23). Für eine Energieübertragung zwischen zwei Chlorophyll a Molekülen beträgt er beispielsweise 80-90 Å und für die Übertragung von β -Carotin auf ein Chlorophyll a Molekül 50 Å.^[74]

Die Energietransferrate lässt sich auch durch das Verhältnis zwischen Förster-Radius R_0 und Abstand zwischen Donor und Akzeptor ermitteln

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (13)$$

mit τ_D als Lebenszeit des angeregten Zustandes des Donormoleküls in Abwesenheit eines Akzeptors und r als Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor kleiner als der Förster-Radius, so dominiert der Energietransfer. Ist der Abstand größer als R_0 , dominiert die Desaktivierung des Donormoleküls.

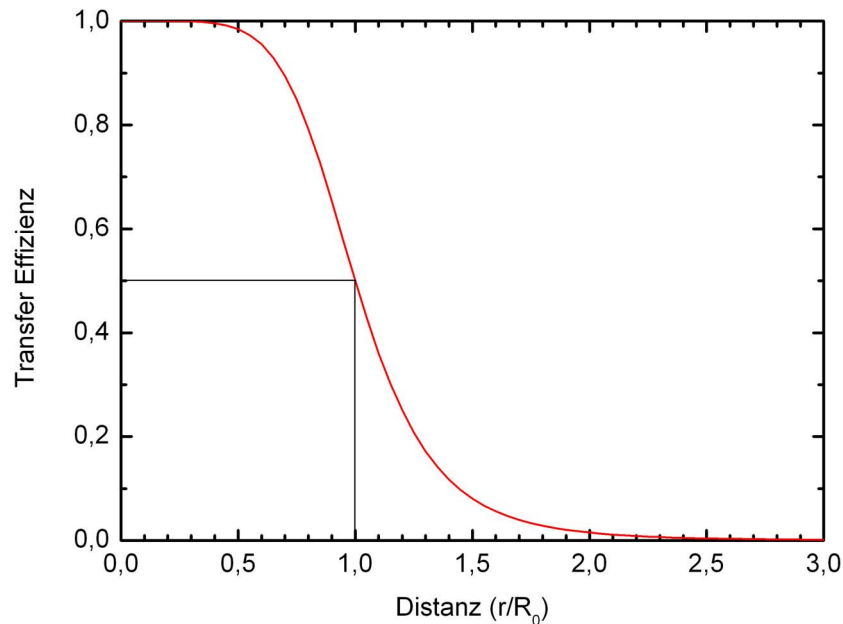


Abb. 23: Abnahme der Transfereffizienz mit Zunahme des Abstandes des Försterpaares.

In der Literatur wird oft für ein gegebenes Donor-Akzeptor-Paar der Förster-Radius angegeben^[75], da dieser alle experimentellen Parameter vereint und somit ein Maß für die Effizienz des Energietransfers ist. Er errechnet sich nach

$$R_0^6 = 8,79 \cdot 10^{-5} \frac{\kappa^2 \cdot J_{AD}}{n^4} \quad (14)$$

mit κ^2 als Orientierungsfaktor, welcher je nach Orientierung von Donor und Akzeptor zueinander Werte zwischen null und vier einnehmen kann. Sind Donor und Akzeptor in Lösung, so ergibt sich ein gemittelter Wert von $2/3$, der häufig auch zur Vereinfachung verwendet wird,

wenn die genauen Ausrichtungen unbekannt sind. Mit n ist der Brechungsindex des Mediums bezeichnet. J_{AD} ist die spektrale Überlappung (s. Abb. 24) zwischen Donor und Akzeptor und ergibt sich zu

$$J_{AD} = \int \varepsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (15)$$

mit f_D als normalisiertem Fluoreszenzspektrum des Donors und ε_A als dem normalisierten Absorptionsspektrum des Akzeptors, wobei zu beachten ist, dass die Verwendung von Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum nicht bedeutet, dass es zu Fluoreszenz und anschließender Absorption kommt. Vielmehr ist eine Überlappung für die energetische Kompatibilität notwendig.^[71]

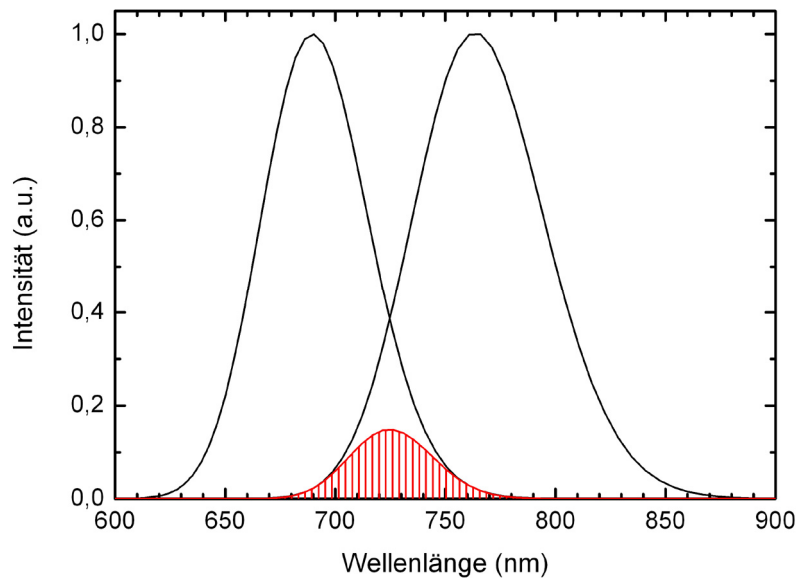


Abb. 24: Fluoreszenz- und Absorptionsspektren mit zugehörigem Überlappungsintegral.

Bei günstiger Ausrichtung von Donor und Akzeptor und guter spektraler Überlappung können mit dem Energietransfer nach Förster auch Distanzen von 100 Å überbrückt werden. Die Abstände zwischen den Lichtsammelpigmenten betragen meist nur 8-16 Å. Bei einer Lebenszeit von 2-4 ns von angeregtem Chlorophyll sind somit bis zu 100 Übertragungen möglich, ohne dass mehr als 10 % der Energie verloren gehen, was die große Effizienz des Photosyntheseapparates eindrucksvoll veranschaulicht (s. Abb. 25).

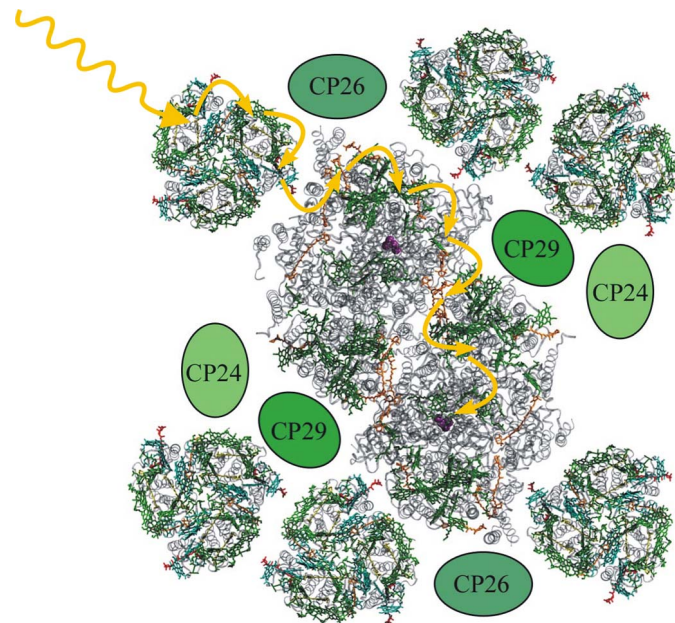


Abb. 25: Schematische Darstellung der Lichtabsorption durch einen Antennenkomplex und schrittweise Übertragung der Energie auf ein Reaktionszentrum (mit Daten aus ^[20, 22] frei nach ^[76]).

2.7.2 Dexter-Energietransfer

Während der Energietransfer nach Förster durch coulombsche Wechselwirkungen induziert wird, erfolgt der Energietransfer nach Dexter durch Überlappung der Wellenfunktionen von Donor und Akzeptor.^[77] Dabei kommt es zu einem Elektronenaustausch zwischen Donor und Akzeptor (s. Abb. 26), weshalb dieser Mechanismus auch oft als Austauschmechanismus bezeichnet wird. Dabei wird das angeregte Elektron des Donor-Moleküls in das LUMO des Akzeptors übertragen und der Akzeptor überträgt ein Elektron aus dem HOMO an den Donor.

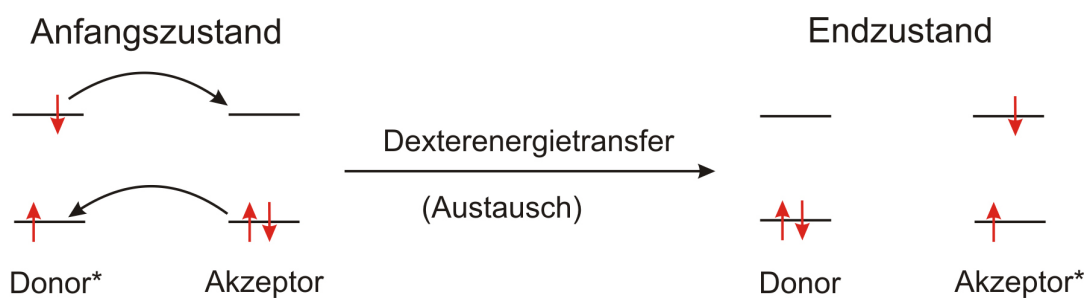


Abb. 26: Energieübertragung im Rahmen des Dexter-Energietransfers.^[48]

Für die Geschwindigkeitskonstante der Energieübertragung von Donor auf Akzeptor fand Dexter den Zusammenhang^[77]

$$k_{ET} = K \cdot J_{AD} \cdot e^{\left(\frac{-2R}{L}\right)} \quad (16)$$

mit J_{AD} als spektralem Überlappungsintegral, K als Maß für die Orbitalwechselwirkungen und L als Summe der van-der-Waals Radien. Der Energietransfer nimmt also exponentiell mit der Entfernung der beteiligten Moleküle ab, weshalb dieser Mechanismus nur über sehr kurze Distanzen wirken kann.

Im Photosyntheseapparat der Pflanzen spielt der Energietransfer nach Dexter bei der Photoprotektion eine Rolle, bei der es zu einer direkten Energieübertragung von ^3Chl oder $^1\text{O}_2$ auf Carotinoide kommt.^[78]

2.8 Exzitonische Zustände

Das Konzept der exzitonischen Wechselwirkungen dient zur Erklärung und Beschreibung der spektralen Eigenschaften, elektronischen Anregungsdynamiken und dem Fluss von Anregungsenergie in molekularen Komplexen und biologischen Strukturen. Exzitonische Zustände werden dabei durch intermolekulare Wechselwirkungen hervorgerufen, wie sie auch zwischen Pigmenten in Lichtsammelkomplexen auftreten. Den dominierenden Anteil besitzen coulombsche Wechselwirkungen, die durch unterschiedliche Verteilungen der Ladungsdichten der beteiligten Moleküle hervorgerufen werden.

Der einfachste Fall sind zwei Moleküle, die sich in engem räumlichen Kontakt zueinander befinden und gleiche Energieniveaus besitzen. Darüber hinaus wird zur Vereinfachung angenommen, dass die beiden Moleküle nur über jeweils zwei Energieniveaus verfügen. In diesem einfachen Modell werden zudem nur Dipol-Dipol-Wechselwirkungen als Näherung der coulombschen Wechselwirkungen betrachtet, da die Multipol-Wechselwirkungen über größere Distanzen vernachlässigt werden können.

Wenn die Moleküle wechselwirken, kommt es zu einer Aufspaltung der zuvor energetisch gleichen angeregten Energieniveaus. Dabei entsteht ein höheres und ein niedrigeres Energieniveau (s. Abb. 27).

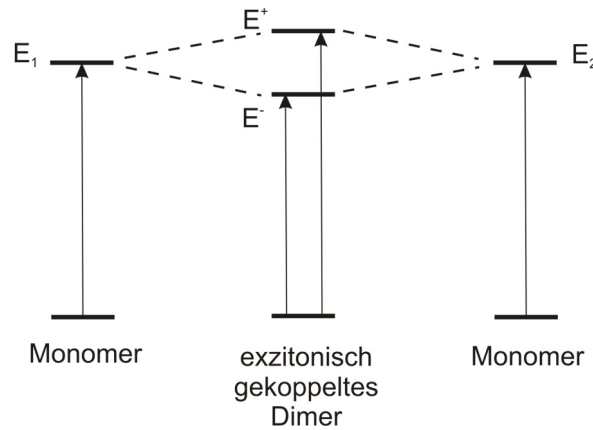


Abb. 27: Schematische Aufspaltung des Energie-Niveaus zweier Monomere unter coulombscher Wechselwirkung (frei nach ^[13]).

Für die Energien der beiden neuen Zustände E^+ und E^- ergibt sich:

$$\begin{aligned} E^+ &= \frac{1}{2}(E_1 + E_2) + V_{12} \\ E^- &= \frac{1}{2}(E_1 + E_2) - V_{12} \end{aligned} \quad (17)$$

mit E_1 und E_2 als Energien der wechselwirkenden Ausgangsenergieniveaus der Monomere und V_{12} als Kopplungsenergie oder *Exciton Splitting*. Die Größe der Aufspaltung hängt dabei sowohl von der Distanz der miteinander wechselwirkenden Pigmente und ihrer Ausrichtung zueinander ab. Die Veränderung der mittleren Energie zwischen den beiden Ausgangszuständen in Bezug auf den Grundzustand wird auch als *Displacement Energy* bezeichnet. Dieser Effekt kann zu einer sichtbaren Verschiebung der Absorptionsspektren in den roten Spektralbereich führen, wenn die Aufspaltung groß genug ist.

Die oben getroffenen Annahmen von gleichen Energieniveaus sind jedoch bei in Proteinen gebundenen Pigmenten meist nicht gegeben. Die unterschiedlichen Umgebungen der Pigmente führen zu individuellen Energieniveaus, die sich alle leicht voneinander unterscheiden. Zudem wird der Pigment-Pool der photosynthetisch aktiven Proteine aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Pigmenten gebildet (s. Kapitel 2.5). Ihre Energieniveaus sind in der Regel nicht gleich, sondern können leichte bis große Unterschiede zueinander aufweisen.

Auch für zwei Pigmente mit unterschiedlichen Energieniveaus können die Wechselwirkungen und die daraus resultierenden Veränderungen der Energieniveaus berechnet werden. Die Berechnung erfolgt dabei analog zum einfachsten Fall und liefert für die neuen Energieniveaus:

$$\begin{aligned} E^+ &= \sqrt{V_{12}^2 + (\delta/2)^2} \\ E^- &= -\sqrt{V_{12}^2 + (\delta/2)^2} \end{aligned} \quad (18)$$

mit δ als Differenz der Ausgangsenergieniveaus.

Es bilden sich also ebenfalls durch Wechselwirkung der Ausgangsenergieniveaus neue Energieniveaus. Wenn die Kopplungsenergie V_{12} wesentlich größer als die Differenz der Ausgangsniveaus δ ist, wird der Grenzfall gleicher Ausgangsenergieniveaus erreicht. Im umgekehrten Fall kommt es zu nahezu keiner Wechselwirkung und die beiden Moleküle behalten ihre eigene Identität.

Da sich in den photosynthetisch aktiven Proteinen eine Vielzahl von Pigmenten befinden, kann in einem letzten Schritt das Modell auf n Pigmente erweitert werden. Unter erneuter Verwendung der Näherung, dass alle beteiligten Pigmente nur zwei Energieniveaus besitzen ergibt sich in diesem Fall, dass die resultierenden Energieniveaus über einen breiten energetischen Bereich aufspalten. In der Summe entsprechen die Energien der neuen Zustände jedoch der Summe der Energien der individuellen Pigmente. Dies wird auch als Summen-Regel bezeichnet. Um jedoch aus vielen beteiligten Pigmenten und ihren Orientierungen zueinander ein experimentell gewonnenes Spektrum modellieren zu können, müssen die zuvor getroffenen Vereinfachungen aufgehoben und die Berechnungen verfeinert werden.^[79]

3 Experimenteller Teil

3.1 Lasersystem

Die Untersuchung der Energietransfer-Mechanismen im Photosyntheseapparat der Pflanzen erfolgt mittels Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz nach Ein-Photonen-Anregung der Chlorophylle und Zwei-Photonen-Anregung der Carotinoide. Während die Ein-Photonen-Anregung der Chlorophylle mittels konventioneller Spektroskopie möglich ist, kommen zur Zwei-Photonen-Anregung der Carotinoide nicht-lineare, spektroskopische Methoden zur Anwendung, wozu monochromatisches Infrarot-Licht benötigt wird. Die Anregungswahrscheinlichkeit bei der Zwei-Photonen-Anregung hängt vom Quadrat der Anregungsintensität ab. Daher sind hohe Intensitäten notwendig, um eine ausreichende Besetzung des angeregten Zustandes zu erreichen. Deshalb erfolgt die Anregung mittels eines Femtosekunden-Lasersystems, da dieses zum einen die hohe Anregungsleistung bietet und zum anderen die Proben durch die gepulsten Strahlen weniger Schaden nehmen als bei kontinuierlicher Bestrahlung. Die verwendeten Komponenten des Laseraufbaus zur Erzeugung der benötigten Strahlung sind in Abb. 28 dargestellt.

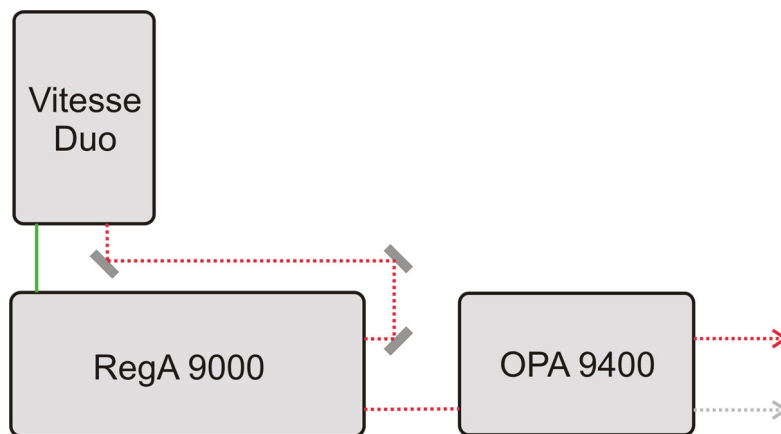


Abb. 28: Schematischer Aufbau des verwendeten Lasersystems.^[48]

Die Femtosekundenpulse werden durch einen Vitesse Duo Laser erzeugt, in welchem ein Verdi-Festkörperlaser einen Laseroszillator pumpt und somit die ultrakurzen Pulse erzeugt werden. Da diese Pulse jedoch noch nicht die benötigte Intensität besitzen, werden sie in einem regenerativen Verstärker (RegA 9000) durch das vom Verdi-Festkörperlaser emittierte Laserlicht verstärkt. Anschließend wird das gepulste Laserlicht hoher Energie in den optisch parametrischen Verstärker (OPA) gelenkt, mit welchem die Erzeugung der für das Experiment benötigten Infrarot-Pulse erfolgt.

Sowohl der Vitesse Duo, der RegA 9000 als auch der OPA 9400 stammen von der Firma Coherent, USA. Im Folgenden werden die einzelnen Komponenten des Lasersystems erläutert und ihre Funktionsweise erklärt. Im Anschluss daran erfolgt die Beschreibung des Gerätes zur Ein-Photonen-Anregung und des Versuchsaufbaus, der im Rahmen der Promotion entworfen wurde.

3.1.1 Vitesse Duo

Bei dem Vitesse Duo handelt es sich um einen Verdi gepumpten Laser, der Femtosekundenpulse mit einer Wiederholrate von 80 MHz bei einer Zentralwellenlänge von ca. 800 nm erzeugt (s. Abb. 29). Der Verdi-Festkörperlaser ist im Vitesse Duo integriert, so dass sich ein geschlossenes und damit wartungsunanfälliges System ergibt.

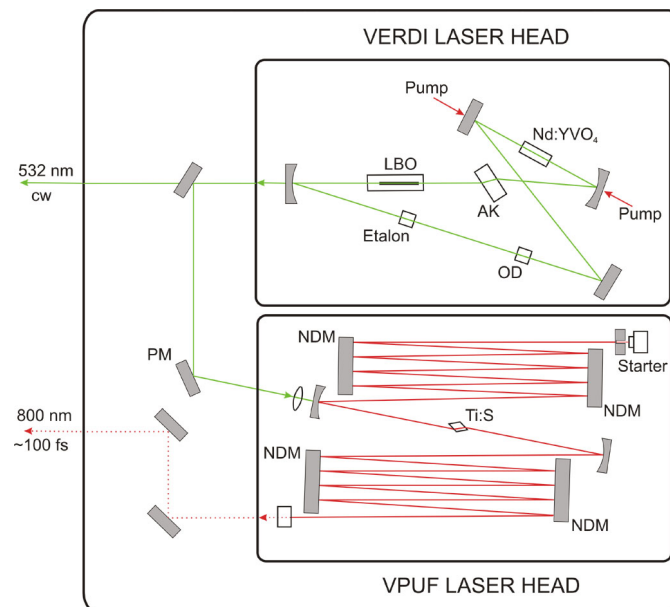


Abb. 29: Schematischer Aufbau des Vitesse Duo Lasers.^[48, 80] LBO: Lithiumtriborat, AK: astigmatischer Kompensator, OD: Optische Diode, Nd:YVO₄: Vanadat, Ti:S: Titan-Saphir Kristall, NDM: *Negative Dispersion Mirror*, PM: *Powertrack Mirror*.

Das Pumpen des Verdi-Festkörperlasers erfolgt über ein Glasfaserkabel, das den Verdi mit einem externen Dioden-Array verbindet. Die Laserdioden emittieren Licht bei 808 nm und pumpen den in der Verdi-Kavität befindlichen Vanadat-Kristall (Nd:YVO₄). Die Emission des Vanadat-Kristalls erfolgt bei 1064 nm, wird jedoch durch den in der Kavität befindlichen Lithiumtriborat-(LBO)-Kristall frequenzverdoppelt. Um einen unidirektionalen Betrieb zu erzwingen, ist weiterhin eine optische Diode in die Kavität integriert. Zur Vermeidung unerwünschter Longitudinal-Moden wird ein Quarzglas-Etalon verwendet.

Über einen teildurchlässigen Spiegel werden 10 W *Continuous Wave-(cw)*-Leistung aus dem Verdi ausgekoppelt, zum hauptsächlichen Teil aus dem Vitesse Duo Laser gelenkt und zum Pumpen des regenerativen Verstärkers verwendet (s. Kapitel 3.1.2). Ein Teil dieses Lichtes wird über einen *Powertrack*-Spiegel in den (*Verdi Pumped Ultra Fast*)-VPUF-Laser gelenkt. Der *Powertrack*-Spiegel sorgt über Steuerung durch piezoelektrische Kristalle für eine optimale Einkopplung des Pumpstrahls in den VPUF-Laser. Der VPUF besteht aus einer Laserkavität, in deren Zentrum sich ein Titan-Saphir-($\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$)-Kristall als Wirtsmedium befindet. Er wird durch das 532 nm Licht angeregt und emittiert bei 800 nm. Um vom *cw-Lasen* auf das gewünschte gepulste *Lasen* zu kommen, muss die Kavität für einen gepulsten Betrieb optimiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Kavität so ausgelegt, dass über einen Starter anfangs erzeugte Intensitätsfluktuationen verstärkt werden, während das *cw*-Licht am *Lasen* gehindert wird. Dies wird über den so genannten Kerr-Linsen-Effekt erreicht.^[81] Dabei wird ausgenutzt, dass durch hohe Intensitäten in bestimmten Kristallen Änderungen der Brechzahl hervorgerufen werden können. In der Mitte des Laserstrahls, in dem die Intensität am höchsten ist, kommt es somit zu einer stärkeren Veränderung des Brechungsindex, wodurch eine Kerr-Linse erzeugt wird, die das Licht hoher Intensität fokussiert. Der Strahldurchmesser der gepulsten Intensitätsschwankung ist somit geringer als der Durchmesser des *cw*-Lichtes. Daher kann über einen schmalen Schlitz hinter dem Kristall anschließend ein Teil des *cw*-Lichtes blockiert und das stärker fokussierte gepulste Licht durchgelassen werden. Wurde dieser Prozess einmal durch den Starter in Gang gesetzt, verstärkt er sich durch die Kavität und hält sich selbstständig am Laufen.

Durch das mehrmalige Durchlaufen des Kristalls in der Kavität erfolgt jedoch eine Verbreiterung des Pulses, da die Unterschiede in der Wellenlänge des Lichtes durch die Dispersion unterschiedliche Laufzeiten im Kristall besitzen. Dieses als *Chirp* bezeichnete Frequenzkontinuum wird über *Negative Dispersion Mirrors* (NDM-Spiegel) ausgeglichen.

Über einen teildurchlässigen Spiegel werden 800 nm Pulse mit einer Länge von ca. 100 fs und einer Leistung von etwa 114 mW aus dem VPUF geleitet und über zwei externe Spiegel in den regenerativen Verstärker gelenkt.

3.1.2 Regenerativer Verstärker (RegA 9000)

Im RegA 9000 werden die im Vitesse Duo erzeugten 800 nm Femtosekundenpulse verstärkt, um ausreichend Energie zur Zwei-Photonen-Anregung zur Verfügung zu haben. Der Aufbau des RegA 9000 ist in Abb. 30 dargestellt.

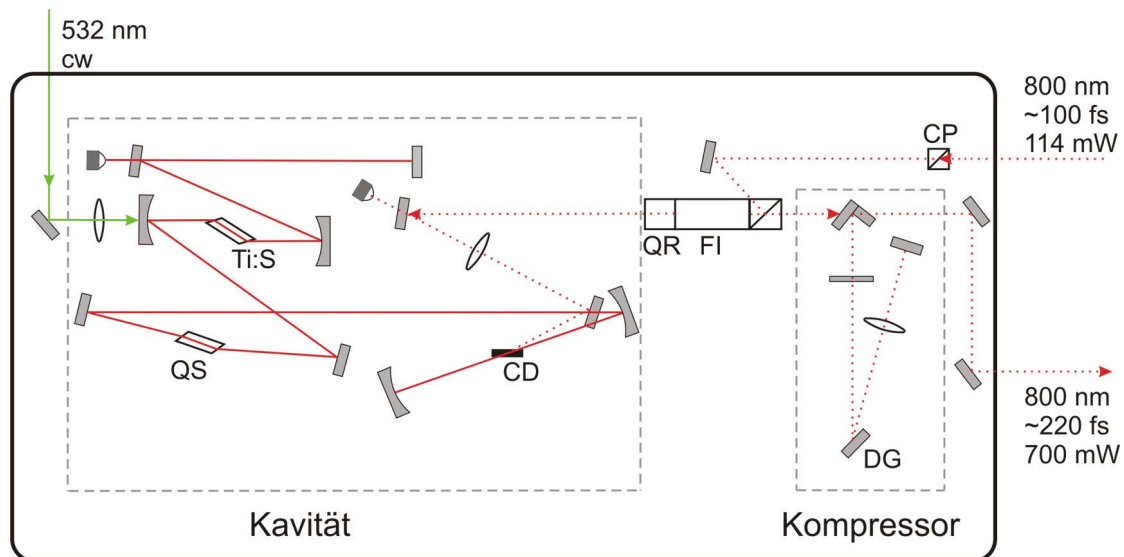


Abb. 30: Schematischer Aufbau des regenerativen Verstärkers RegA 9000.^[48, 82] QS: *Q-Switch*, CD: *Cavity Dumper*, FI: *Faraday Isolator*, CP: *Cube Polarizer*, DG: *Diffraction Grating*, Ti:S: Titan-Saphir Kristall, QR: Quarz-Rotator

Im RegA 9000 wird als Verstärkermedium ein Titan-Saphir-Kristall verwendet, der sich in einer Kavität befindet. Dieser wird mit dem kontinuierlichen 532 nm Laserstrahl des Vitesse Duo gepumpt, um genügend Energie zur Verstärkung der Femtosekundenpulse zu erlangen. Damit sich genügend Energie aufbauen kann, muss in der Kavität unerwünschtes *Lasen* verhindert werden, weshalb ein *Q-Switch* als Güteschalter in die Kavität integriert ist. Bei ihm handelt es sich um einen aus Tellurdioxid bestehenden akusto-optischen Modulator, der durch eine akustische Welle seine Brechkraft ändert und für die Dauer des Energieaufbaus im Titan-Saphir Kristall den Strahl in der Kavität ablenkt und somit das Zustandekommen von *Lasen* unterbindet.

Der aus dem Vitesse Duo kommende Femtosekundenpulszug wird über den *Faraday Isolator* in Richtung Kavität gelenkt. Dabei verhindert der *Faraday Isolator* ein Zusammenlaufen von dem eingehenden und dem ausgehenden Pulszug. Dazu wird die ursprüngliche horizontale Polarisation durch den kubischen Polarisator um $\lambda/2$ gedreht. Über einen Umlenkspiegel wird der Strahl auf einen im *Faraday Isolator* integrierten Spiegel geworfen, der für senkrecht polarisiertes Licht reflektiv und für horizontales transmittiv ist. Der Strahl wird durch den *Faraday Isolator* gelenkt, der die Polarisation um $\lambda/4$ dreht. Anschließend durchläuft er den Quarz-Rotator, der die Polarisation um weitere $\lambda/4$ dreht, so dass der Strahl wie zu Beginn horizontal polarisiert ist. In umgekehrte Richtung dreht der Quarz-Rotator die Polarisation um $-\lambda/4$ und der *Faraday Isolator* wiederum um $\lambda/4$, so dass die horizontale Polarisation wieder hergestellt wird und der Strahl in umgekehrter Richtung den in den *Faraday Isolator* integrierten Spiegel passieren kann.

Der über den *Faraday Isolator* in Richtung Kavität gelenkte Pulszug trifft auf den *Cavity Dumper*, bei dem es sich ebenso wie beim *Q-Switch* um einen aus Tellurdioxid bestehenden akusto-optischen Modulator handelt. Normalerweise wird der eingehende Pulszug durch den *Cavity Dumper* transmittiert, so dass kein Puls in die Kavität gelenkt wird. Über einen zum Pulszug synchronisierten 400-MHz-Radiopuls kann jedoch die Brechzahl des Tellurdioxid-Kristalls geändert werden, sobald sich genügend Energie im Titan-Saphir-Kristall aufgebaut hat. Durch die Änderung der Brechzahl werden 50 % des selektierten Pulses abgelenkt und 50 % transmittiert. Über einen Hohlspiegel werden sie zurück in den *Cavity Dumper* reflektiert, in welchem sie über interferometrische Effekte zu 100 % in die Kavität eingespeist werden.

Zeitlich synchronisiert zur Einspeisung des Pulses in die Kavität wird der *Q-Switch* ausgeschaltet, so dass das *Lasen* nicht mehr unterdrückt wird und der Puls durch 25 bis 30 Umläufe in der Kavität durch die im Titan-Saphir-Kristall gespeicherte Energie maximal verstärkt wird. Nach erfolgter Verstärkung wird mittels eines erneuten akustischen Pulses im *Cavity Dumper* der verstärkte Puls ausgekoppelt und der *Q-Switch* wieder eingeschaltet, damit sich im Titan-Saphir-Kristall wieder genug Energie aufbauen („regenerieren“) kann. Die Wiederholrate der ausgekoppelten Pulse liegt bei etwa 125 kHz, was bedeutet, dass jeder 640te Puls selektiert und verstärkt wird.

Bei den 25 bis 30 Umläufen in der Kavität wirkt der *Q-Switch* als disperses Element, was dazu führt, dass die unterschiedlichen Wellenlängenanteile des Pulses zeitlich gestreckt werden. Dies ist nötig, damit Leistungsspitzen im Verstärkungsprozess vermieden werden, die den Titan-Saphir-Kristall beschädigen oder zu unerwünschten optischen Effekten führen könnten. Allerdings verlängert sich dabei die Pulslänge auf etwa 30 ps, so dass eine Kompression erfolgen muss, um die gewünschten Femtosekundenpulse zu erhalten (s. Abb. 31).

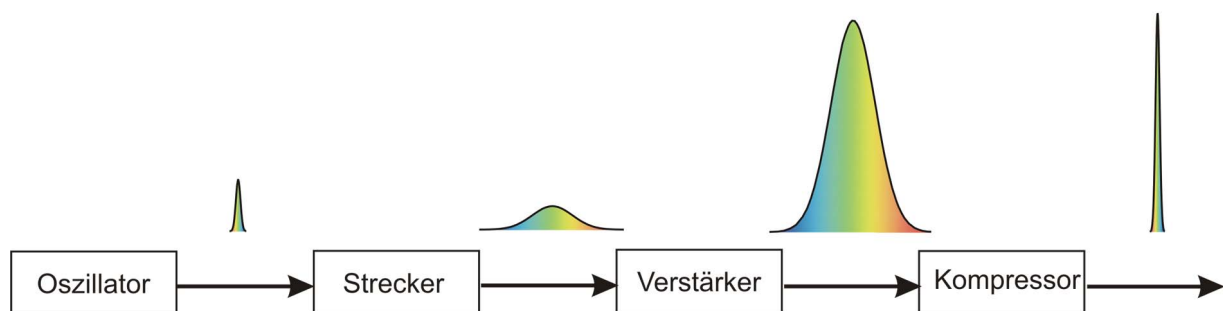


Abb. 31: Prinzip der erfolgreichen Pulsverbreiterung zur Vermeidung von Leistungsspitzen, anschließende Verstärkung und Kompression der Pulse.

Dieser Vorgang erfolgt im Kompressor, dessen zentrales Bauteil ein optisches Gitter ist, das die zeitlich zuerst ankommenden Anteile anders als die später kommenden blauen Anteile beugt, so dass dieser spektrale Versatz durch einen vierfachen Durchlauf des Gitters aufgehoben werden kann. Nach Verlassen des Kompressors werden die verstärkten und auf etwa 220 fs komprimierten Pulse aus dem RegA ausgekoppelt und in den optisch parametrischen Verstärker gelenkt.

3.1.3 Optisch parametrischer Verstärker (OPA 9400)

Zur Durchführung der Zwei-Photonen-Anregung von Carotinoiden muss eine Frequenzkonversion der ursprünglichen 800 nm Pulse erfolgen. Dazu wird ein optisch parametrischer Verstärker verwendet, mit dem die Wellenlänge über einen weiten Bereich durchstimmbar ist. Der Aufbau des verwendeten Verstärkers ist in Abb. 32 dargestellt.

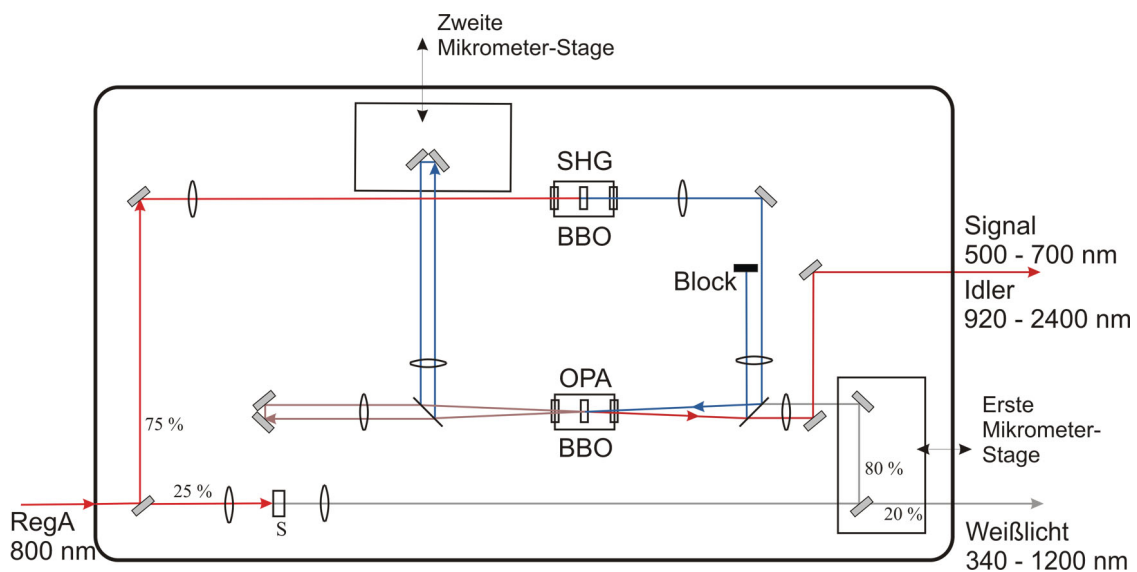


Abb. 32: Schematischer Aufbau des optisch parametrischen Verstärkers.^[48, 83] S: Saphir-Kristall, SHG: BBO-Kristall zur Frequenzverdopplung (*Second Harmonic Generation*), OPA: BBO-Kristall zur Frequenzmischung (*Optic Parametric Amplification*)

Das Prinzip der optisch parametrischen Verstärkung beruht auf der Umwandlung eines Pump-Photons in zwei Photonen unterschiedlicher Wellenlänge, die als *Signal*-Puls und *Idler*-Puls bezeichnet werden. Im Falle des OPA 9400 kann die *Signal*-Wellenlänge zwischen 500 und 700 nm liegen und die des *Idlers* zwischen 920 und 2400 nm. Bei dieser Umwandlung muss die Energiebilanz eingehalten werden, so dass gilt:

$$\nu_{Pump} = \nu_{Signal} + \nu_{Idler} \quad (19)$$

Um die Frequenzdurchstimmung durchzuführen wird zunächst der Pump-Strahl erzeugt. Dazu werden 75 % der Energie des aus dem RegA kommenden Pulses über einen teilreflektiven Spiegel ausgekoppelt und über eine Linse in einen Beta Barium Borat-(BBO)-Kristall fokussiert. Durch nichtlineare optische Effekte wird in diesem Kristall der Puls frequenzverdoppelt, so dass 400 nm Pulse resultieren. Über einen Umlenkspiegel, eine Linse und dielektrischen Spiegel, der nur für 400 nm reflektiv ist, wird der Puls in einen zweiten BBO-Kristall fokussiert, in dem der eigentliche Prozess der optisch parametrischen Verstärkung stattfindet.

Die restlichen 25 % der Energie werden in ein Saphir-Plättchen fokussiert, in welchem es zur Weißlichterzeugung kommt. Dies geschieht durch die erzeugten hohen Lichtintensitäten im Saphirplättchen, wodurch es zu einer Brechzahländerung kommt, die wiederum Selbstfokussierung und Selbstphasenmodulation bewirkt. Aus dem ursprünglichen Puls mit einer Zentralwellenlänge von 800 nm wird ein breitbandiges Wellenlängenkontinuum erzeugt, das von etwa 340 – 1200 nm reicht, so dass das entstehende Licht dem menschlichen Auge weiß erscheint. Jedoch werden nur ca. 5 % über den kompletten Bereich verschoben, während der Hauptteil nahe bei 800 nm bleibt. Der erzeugte Weißlichtpuls weist einen starken positiven *chirp* auf, das heißt, dass sich die roten Anteile am Anfang des Pulses befinden und die blauen Anteile am Ende.

Dieser Weißlichtpuls wird nun im zweiten BBO-Kristall mit dem Pump-Puls überlagert, worauf es zur parametrischen Verstärkung kommt. Mittels einer Mikrometerstage kann ein Weg- und damit Zeitversatz des Weißlichtpulses erzeugt werden, und somit ein beliebiger Teil des Wellenlängenkontinuums mit dem Pump-Puls überlagert werden. Nach Gl. (19) wird die über die Mikrometerstage selektierte Wellenlänge verstärkt und eine zusätzliche Wellenlänge, der sogenannte *Idler*, generiert. Der *Idler* erzeugt über Wechselwirkung mit dem Pump-Puls nach Gl. (19) Licht mit der Wellenlänge des *Signals*. Dieser Prozess setzt sich alternierend fort, wodurch die Intensität von *Signal* und *Idler* immer mehr zunehmen.

Da beim ersten Durchgang durch den BBO-Kristall die selektierten Wellenlängen noch nicht genug verstärkt sind, werden Pump-Strahl und *Signal/Idler*-Strahl über einen dielektrischen Spiegel getrennt, retroreflektiert und erneut im BBO zur Überlagerung gebracht, um einen Sättigungszustand der drei Wellenlängen zu erreichen. *Signal* und *Idler* werden über den ersten dielektrischen Spiegel vom Pump-Puls separiert und mittels weiterer Spiegel aus dem OPA ausgekoppelt.

Signal und *Idler* stehen somit für Experimente zur Verfügung, ebenso wie ein Teil des Weißlichtes, das über einen eins zu fünf Strahlenteiler die erste *Stage* passieren konnte.

3.2 PAM Fluorometer (Pulse Amplitude Modulation)

Die Chlorophyll *a*-Fluoreszenz stellt eine wichtige Signatur der photosynthetischen Aktivität der Pflanzen dar.^[26] Da diese Fluoreszenz mit den Prozessen der qP und qN bzw. NPQ konkurriert, lassen sich durch Beobachtung und Analyse der Fluoreszenzintensität Rückschlüsse über Veränderungen in der Nutzung der Lichtenergie ziehen.

Zur Beobachtung der Chlorophyll *a*-Fluoreszenz hat sich ein Standardgerät etabliert, das es erlaubt, die einzelnen Bestandteile des NPQ *in vivo* zu untersuchen. Hierbei handelt es sich um das von Schreiber entwickelte *Pulse Amplitude Modulation* (PAM) Fluorometer.^[84]

Kernstück des Fluorometers ist die Steuerbox, die die notwendige Elektronik, die Detektionseinheit und die Lichtquellen zur Bestrahlung enthält. An die Box ist ein Glasfaserkabel angeschlossen, das Licht auf die zu untersuchende Pflanze lenkt sowie die Fluoreszenz einfängt und zum Detektor in der Box leitet. Zur Untersuchung enthält das PAM-Fluorometer drei verschiedene Lichtquellen, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen.

Bei der ersten Lampe handelt es sich um eine Halogenlampe, die ein breites Wellenlängenspektrum emittiert, wodurch das Sonnenlicht simuliert wird. Dieses Licht wird auch als aktinisches Licht bezeichnet und kann zwischen 0 und 2500 $\mu\text{Einstein}$ variiert werden. Für einzelne Sättigungspulse können Intensitäten zwischen 0 und 12000 $\mu\text{Einstein}$ gewählt werden. Die Emission der Halogenlampe reicht von 400 bis 770 nm, wobei im verwendeten Aufbau ein Filter in den Strahlengang eingebaut wurde (AHF Analysentechnik, OD6 >700 nm), um das Streulicht bei der Detektion der Chlorophyll-Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung der Carotinoide zu verringern.

Zur Messung der Fluoreszenzausbeute wird das so genannte modulierte Messlicht (*Measuring Light*) verwendet. Dabei handelt es sich um moduliertes 594 nm Licht geringer Intensität, das von einer LED-Lampe emittiert wird. Das Detektionssystem muss äußerst selektiv sein, um in der Lage zu sein, die durch das modulierte Messlicht hervorgerufene Fluoreszenz von Umgebungslicht und der weitaus höheren Fluoreszenz, die durch das aktinische Licht hervorgerufen wurde, zu trennen. Zu diesem Zweck wird moduliertes Licht verwendet, so dass die hervorgerufenen Schwankungen der Fluoreszenz die gleiche Modulation aufweisen, wodurch die Fluoreszenzausbeute von den restlichen Fluoreszenzsignalen und Streulicht durch die Elektronik getrennt werden kann.

Die dritte Lichtquelle ist eine weitere LED, die nicht moduliert ist und bei 720 nm emittiert. Sie wird als *Far Red*-Licht bezeichnet und dient zur selektiven Anregung des PSI.

An Pflanzen wurde eine Standardprozedur entwickelt (s. Abb. 33), um Einblicke in die Prozesse des NPQ zu erhalten.^[85] Zunächst muss die zu untersuchende Pflanze 30 Minuten dunkeladaptiert werden, wodurch sämtliche noch im Blatt ablaufenden Photosyntheseprozesse im Rahmen der Lichtreaktion zum Erliegen kommen und insbesondere die Elektronenakzeptoren Q_A und Q_B im oxidierten Zustand vorliegen. Damit sind die Reaktionszentren für eine erneute Ladungstrennung bereit, so dass sie als „offen“ bezeichnet werden.

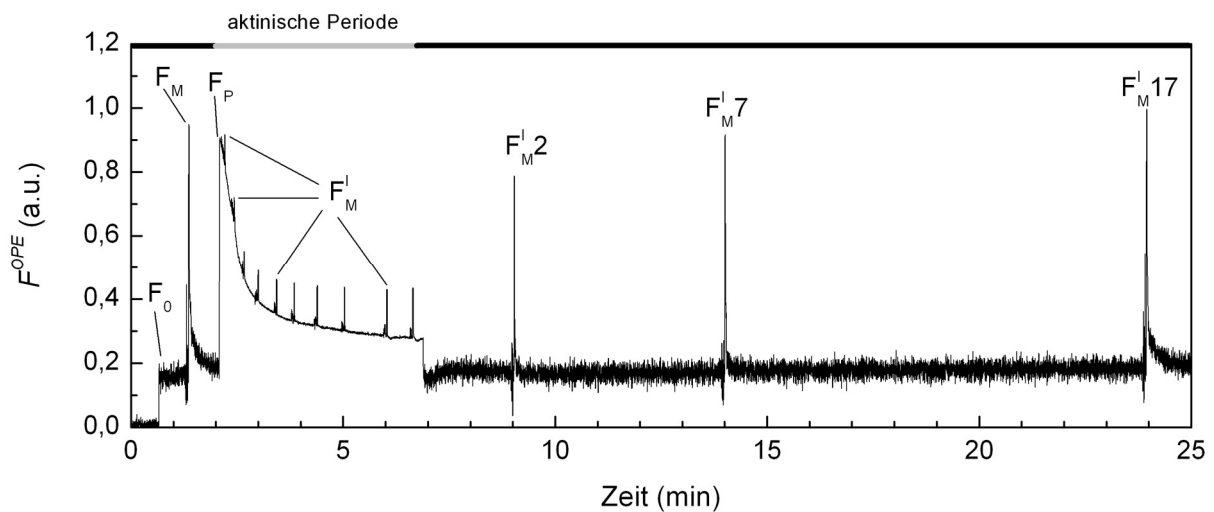


Abb. 33: Verlauf einer typischen Messung an einer Pflanze mit dem PAM-Fluorometer.

Durch Einschalten des modulierten Messlichtes wird die so genannte Grundfluoreszenzausbeute F_0 erhalten. Durch die geringe Intensität des modulierten Messlichtes erfolgt keine Änderung des Adaptionszustandes des Blattes, so dass das Blatt nach wie vor als dunkeladaptiert bezeichnet wird. Mittels eines kurzen intensiven Lichtpulses durch die Halogenlampe werden die Reaktionszentren kurzzeitig gesättigt, so dass die modulierte Fluoreszenzausbeute auf den Maximalwert F_M ansteigt, da nahezu sämtliche Energie des modulierten Lichtes nicht mehr von den Reaktionszentren aufgenommen werden kann. Der Wert entspricht der maximalen *Quenching*-Kapazität der Pflanze im dunkeladaptierten Zustand.

Direkt nach diesem sättigenden Lichtpuls erfolgt eine Beleuchtung des Blattes für drei Sekunden mit dem *Far Red*-Licht, wodurch das PSI selektiv angeregt wird und damit die Reaktionszentren des PSII wieder in den offenen Zustand versetzt werden.^[86]

Im Anschluss erfolgt die aktinische Phase, in der mittels der Halogenlampe das Sonnenlicht simuliert und die Anpassung des Blattes an die veränderten Lichtbedingungen beobachtet wird. Da das aktinische Licht nicht-sättigend betrieben wird, steigt die Fluoreszenzausbeute

nicht bis zum Maximalwert an, sondern nur bis zum Wert F_p . Während der aktinischen Phase erfolgen die im Theorie-Kapitel erläuterten Prozesse, in denen die Pflanze einen pH-Gradienten aufbaut, die Ingangsetzung des Xanthophyllzyklus erfolgt und sich die weiteren, zum Teil noch unbekannten Veränderungen vollziehen, mit denen sich die Pflanze auf hohe Lichteinstrahlung einstellt. Im Verlauf dieser Prozesse fällt die Fluoreszenzausbeute ab.

Während dieser Phase werden weitere sättigende Lichtpulse appliziert, wodurch die Fluoreszenz F_M' des sich anpassenden Photosyntheseapparates erhalten wird. Das Verhältnis zwischen der Maximalfluoreszenz F_M und dem Wert F_M' zu einem beliebigen Zeitpunkt gibt über Gl. (20) den Wert des nicht-photochemischen *Quenchings* an.^[85]

$$NPQ = \frac{F_M - F_M'}{F_M'} = \frac{F_M}{F_M'} - 1 \quad (20)$$

Durch die Verwendung einer Verhältnissgröße anstatt absoluter Werte sind somit auch unterschiedliche photosynthetische Systeme miteinander vergleichbar.

Sind die Anpassungsprozesse in der Pflanze abgeschlossen, so nähert sich die Fluoreszenzausbeute einem Plateau-Wert. Das aktinische Licht wird abgeschaltet und mit einem kurzen Lichtpuls mit dem *Far Red*-Licht dafür gesorgt, dass die Reaktionszentren des PSII wieder offen sind.

Anschließend wird die Pflanze wieder für einen längeren Zeitraum dunkeladaptiert, um die Pflanze erneut in den ursprünglichen Zustand zu versetzen. Während dieser Zeit werden erneut kurze sättigende Lichtpulse gefolgt von *Far Red*-Pulsen benutzt, um die Veränderung von F_M' zu beobachten und damit den NPQ-Wert während der Dunkeladaption zu erhalten.

3.3 Messaufbau zur simultanen Fluoreszenz-Detektion

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde ein Fluoreszenz-Messaufbau entworfen, der es ermöglicht, sowohl an intakten Pflanzen als auch an isolierten Pigment-Protein-Komplexen Fluoreszenzmessungen nach Ein-Photonen-Anregung der Chlorophylle sowie nach Zwei-Photonen-Anregungen der Carotinoide durchzuführen (s. Abb. 34).

Bei sich in Lösung befindlichen Lichtsammelproteinen handelt es sich um ein vereinfachtes System. Die Messungen finden außerhalb des lebenden Organismus statt und die aus diesen *in vitro*-Bedingungen erhaltenen Ergebnisse lassen sich wesentlich leichter interpretieren, als es bei *in vivo*-Experimenten möglich wäre. Der große Vorteil der damit einhergehenden Verein-

fachung stellt jedoch auch gleichzeitig das größte Problem solcher Messungen dar. Es können zwar Aussagen zu den einzelnen Bestandteilen des Photosyntheseapparates gemacht werden, aber gerade die in der Biologie sehr wichtigen Wechselwirkungen der einzelnen Bestandteile untereinander werden komplett vernachlässigt. Ein Gerät, das sowohl unter *in vivo*- als auch *in vitro*-Bedingungen verwendet werden kann, vereint dabei die Vorteile der beiden Systeme und wurde daher im Rahmen der Doktorarbeit entwickelt.

Um darüber hinaus eine Vergleichbarkeit zu wissenschaftlichen Arbeiten von Biologen herstellen zu können, fiel die Entscheidung, ein kommerziell erhältliches PAM-Fluorimeter mit dem Femtosekunden-Lasersystem zu kombinieren. Der Aufbau wurde dabei so konstruiert, dass das durch das PAM hervorgerufene Streulicht der Halogenlampe und die hohe durch das PAM erzeugte Fluoreszenz die separate Detektion der wesentlich schwächeren Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung nicht stört. Die zentrale Komponente des entworfenen Systems ist der Konfokalaufbau, durch den es möglich ist, die beiden Messprinzipien simultan, aber ungestört voneinander durchzuführen. Die Messung erfolgt dabei an der gleichen Stelle der Probe, wobei die Fläche der Zwei-Photonen-Anregung kleiner ist, da die hohen Anregungsintensitäten eine Fokussierung notwendig machen.

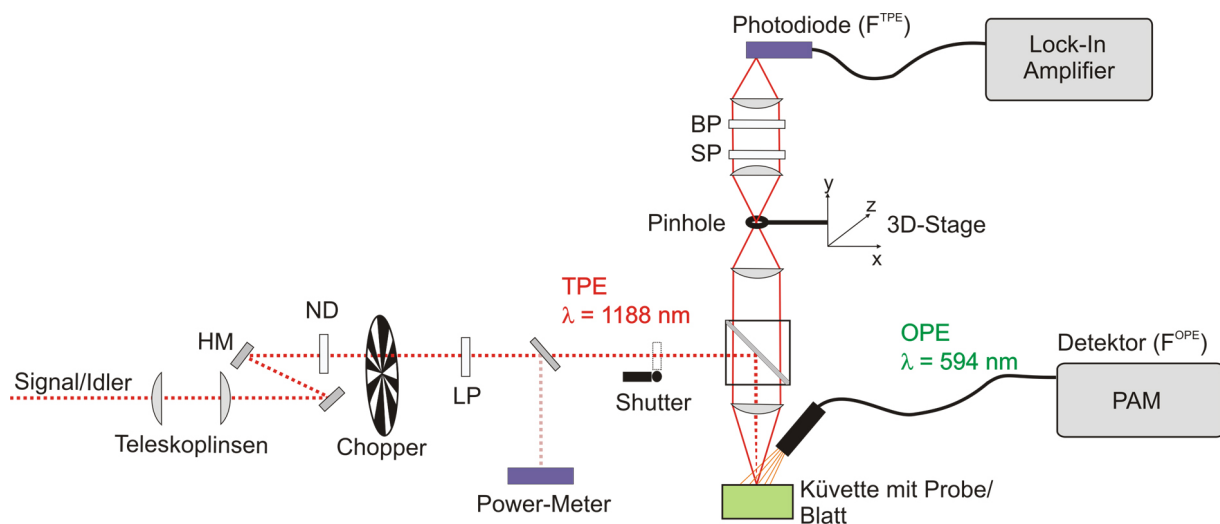


Abb. 34: Schematische Darstellung des verwendeten Messaufbaus zur gemeinsamen Detektion von Fluoreszenz nach Chl- bzw. Car-Anregung. - HM: *Hot Mirror*, BP: *Band-Pass Filter* (680-720 nm), SP: *Short-Pass Filter* (<1100 nm), LP: *Long-Pass Filter* (>900 nm), ND: variabler *Neutral Density Filter*, PAM: *Pulse Amplitude Modulation Fluorometer*.

Die mit einem Silberspiegel (New Focus, Reflektion > 95 %, $\lambda = 0,45\text{-}12 \mu\text{m}$) aus dem OPA reflektierten *Signal*- und *Idler*-Pulse liegen zunächst noch übereinander und sind auch nicht perfekt kollimiert. Daher durchlaufen sie zunächst gemeinsam einen Teleskopaufbau aus zwei

achromatischen Linsen (Thorlabs, $f = 100$ mm), um eine vollständige Kollimation zu erreichen. Zur Vermeidung von Reflektionsverlusten des *Idlers* sind die Linsen für den IR-Bereich optimiert. Da zur Zwei-Photonen-Anregung nur die IR-Pulse benötigt werden, durchlaufen *Signal* und *Idler* zunächst einen *Hot Mirror* (Edmund Optics, Reflektion ≥ 95 %, 750-1250 nm), der nur für IR-Licht reflektiv ist, und anschließend einen 900 nm *Long-Pass*-Filter (Thorlabs, > 900 nm) um für eine vollständige Unterdrückung der *Signal*-Wellenlänge zu sorgen. Um eine beliebige Anregungsintensität wählen zu können, durchläuft der *Idler* einen variablen Neutralfilter, mit dem die Leistung um einen einstellbaren Wert verringert werden kann. Somit ist eine intensitätsabhängige Signaluntersuchung möglich und es kann auch auf das Vorliegen von Zwei-Photonen-Anregung getestet werden. Des Weiteren ist ein *Shutter* in den Strahlengang integriert, um das Anregungslicht blocken zu können. Dadurch werden die Proben nur im Messzeitraum mit dem Anregungslicht bestrahlt und Effekte wie *Photobleaching* können minimiert werden.

Als nächstes wird das *Idler*-Licht in den Konfokalaufbau gelenkt, in dem ein Strahlteiler (AHF Analysentechnik, Reflektion ≥ 90 %, 750-1200 nm, Transmission ≥ 90 %, 410-700 nm) das Licht auf die zu untersuchende Probe lenkt, aber für die detektierte Fluoreszenz durchlässig ist. Der *Idler* wird mittels einer für den nah-IR-Bereich optimierten achromatischen Linse (Thorlabs, $f = 40$ mm, Reflektion ≤ 2 %, 650-1200 nm) auf die Probe fokussiert. Diese sammelt und kollimiert auch die emittierte Fluoreszenz, so dass sie den Strahlteiler durchlaufen kann. Durch zwei achromatische Linsen (Thorlabs, $f = 30$ mm, Reflektion ≤ 2 %, 650-1200 nm) wird ein Zwischenfokus erzeugt, in den ein 100 μm *Pinhole* mit einer 3D-*Stage* positioniert werden kann, um bei Messungen an Pflanzen die durch das PAM hervorgerufene Streufluoreszenz zu unterdrücken. Die Chlorophyll-Fluoreszenz wird über einen *Short-Pass*-Filter (Thorlabs, < 1100 nm) und einen *Band-Pass*-Filter (Thorlabs, 680-720 nm) selektiert und über eine weitere Linse (Thorlabs, $f = 25,4$ mm) in eine schnelle Photodiode (Design Prof. Dr. Schwarzer) fokussiert.

Zur Erhöhung der Sensitivität der Fluoreszenzmessung nach Zwei-Photonen-Anregung wird das Anregungslicht mit einem *Chopper* moduliert ($f \approx 1000$ Hz) und die somit modulierte Fluoreszenz über ein mit der schnellen Photodiode verbundenen *Lock-In-Amplifier* (EG & G 5205, Dumberry, Canada) vom Rauschen getrennt und verstärkt. Das Signal wird über eine A/D-Wandlerkarte (DT304, Data Translation, Marlboro, MA, USA) digital transformiert und über eine selbst erstellte Messsoftware (angefertigt mit Measure Foundry) ausgewertet. Um Verfälschungen durch schwankende Anregungslicht-Intensitäten auszuschließen, wurde ein 40:1 Strahlteiler in den Anregungsstrahlengang integriert, der einen kleinen Teil des Anre-

gungslichtes auf einen Detektor lenkt. Dieser gibt ebenfalls über die A/D-Wandlerkarte das aufgezeichnete Signal an die Messsoftware weiter. Während der Messungen kann so eine gleich bleibende Intensität von 700 μW gewährleistet werden.

Der zweite Teil des Messaufbaus besteht aus dem PAM-Fluorometer, welches zur Ein-Photonen-Anregung der Chlorophylle und der Detektion der von ihnen emittierten Fluoreszenz dient. Zur Unterdrückung des durch die Halogenlampe hervorgerufenen Streulichtes wurde das Gerät jedoch mittels eines Interferenzfilters modifiziert (AHF Analysentechnik, OD 6 bei 700-1100 nm). Dieser blockierte den über 700 nm liegenden Teil des Sonnenlicht-imitierenden Halogenlichtes, wodurch das Signal/Rausch-Verhältnis des Zwei-Photonenaufbaus stark gesteigert werden konnte.

Die Aufzeichnung des PAM-Signals erfolgte mit der mit dem Gerät mitgelieferten Standardsoftware. Die Intensität des modulierten Lichtes betrug in den Messungen stets die am Gerät einstellbare niedrigste Stufe 1, welche das beste Signal/Rausch-Verhältnis aufwies. Für Messungen an extrahierten oder rekonstituierten Proben wurde nur das modulierte Anregungslicht verwendet und zur Signalverstärkung zusätzlich das *Pinhole* entfernt, da Ein- und Zwei-Photonen-Anregung separat voneinander erfolgen konnten. Für Pflanzenmessungen wurde am PAM für das aktinische Licht die Stufe 20 eingestellt, was etwa 350 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entspricht, während für die sättigenden Pulse die Stufe 60 mit einer Intensität von etwa 5000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gewählt wurde. Die während der Lichtadaption der Pflanzen und während des Einsatzes der sättigenden Pulse auftretenden hohen Streusignale machten bei Pflanzen-Messungen die Verwendung des *Pinholes* unumgänglich. Die Messung mit dem PAM erfolgte wie in der Literatur beschrieben^[85], wobei vor den sättigenden Lichtpulsen jeweils ein zwei Sekunden langer manuell gesteuerter sättigender Zwei-Photonen-Puls mittels des IR-Lichtes durchgeführt wurde.

3.4 Wechselwirkungsparameter $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_I\text{-Chl}}$

Die mit den kombinierten Messsystemen aufgenommenen Fluoreszenzen F^{OPE} und F^{TPE} werden dazu verwendet, den Wechselwirkungsparameter $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_I\text{-Chl}}$ zu berechnen (s. Gl. (21)). Dies trifft sowohl für die Messungen an isolierten Protein-Komplexen als auch auf Messungen an Pflanzen *in vivo* zu.

$$\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_I\text{-Chl}} = \frac{F^{\text{TPE}}}{F^{\text{OPE}}} \quad (21)$$

Der Parameter lässt Rückschlüsse auf den Energietransfer von Car S_1 auf Chl zu und gibt damit Informationen über die zwischen diesen Molekülen auftretenden Wechselwirkungen. Die Herleitung des Parameters erfolgt durch die folgenden Überlegungen. Die emittierte Anzahl von Fluoreszenzphotonen nach OPE der Chlorophylle $N_{F(Chl)}^{OPE}(t)$ entspricht der Anzahl an durch die Chlorophylle des Pigment-Pools absorbierten Photonen $N_{Abs(Chl)}^{OPE}$ multipliziert mit der Fluoreszenz-Quantenausbeute $\Phi_{F(Chl)}(t)$. Sie stellt den Anteil der Chlorophyll-Anregungsenergie dar, der nicht durch Photochemie des Reaktionszentrums oder andere Prozesse des nicht-photochemischen *Quenchings* abgefangen wurde.

$$N_{F(Chl)}^{OPE}(t) = N_{Abs(Chl)}^{OPE} \cdot \Phi_{F(Chl)}(t) \quad (22)$$

Die Zeit t soll dabei die zeitabhängigen Veränderungen der Parameter von Pflanzen und isolierten Protein-Komplexe symbolisieren.

Die von Chlorophyll emittierte Anzahl von Fluoreszenzphotonen nach TPE der dunklen Carotinoid-Zustände, $N_{F(Chl)}^{TPE}(t)$, ist jedoch zusätzlich zum Anteil der Anregungsenergie $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}(t)$ proportional, der von den Carotinoiden auf die Chlorophylle übertragen wird. Dieser Faktor ist von den zwischen Carotinoiden und Chlorophyllen auftretenden Wechselwirkungen abhängig:

$$N_{F(Chl)}^{TPE}(t) = N_{Abs(Car S_1)}^{TPE} \cdot \Phi_{F(Chl)}(t) \cdot \Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}(t) \quad (23)$$

Hier steht $N_{Abs(Car S_1)}^{TPE}$ für die Anzahl der durch die Carotinoide absorbierten Photonenpaare pro Zeiteinheit.

Durch Division von Gl. (23) durch Gl. (22) ergibt sich:

$$\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}(t) = \frac{N_{F(Chl)}^{TPE}(t) / N_{Abs(Car S_1)}^{TPE}}{N_{F(Chl)}^{OPE}(t) / N_{Abs(Chl)}^{OPE}} \quad (24)$$

Die detektierte Fluoreszenzintensität sowohl für OPE als auch für TPE ist darüber hinaus proportional zu der Anzahl an emittierten Photonen pro Zeiteinheit:

$$\begin{aligned} F^{OPE}(t) &\propto N_{F(Chl)}^{OPE}(t) \\ F^{TPE}(t) &\propto N_{F(Chl)}^{TPE}(t) \end{aligned} \quad (25)$$

Unter konstanten Anregungsintensitäten ($N_{Abs(Car S_1)}^{TPE}$ und $N_{Abs(Chl)}^{OPE} = \text{konstant}$) ist daher $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}(t)$ proportional zum Verhältnis aus Fluoreszenz nach Ein-Photonen-Anregung $F^{OPE}(t)$ und Zwei-Photonen-Anregung $F^{TPE}(t)$:

$$\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}(t) = \frac{N_{F(Chl)}^{TPE}(t)}{N_{F(Chl)}^{OPE}(t)} \cdot \frac{N_{Abs(Chl)}^{OPE}}{N_{Abs(Car S_1)}^{TPE}} = \frac{N_{F(Chl)}^{TPE}(t)}{N_{F(Chl)}^{OPE}(t)} \cdot c \propto \frac{F^{TPE}(t)}{F^{OPE}(t)} \quad (26)$$

Aufgrund der Normalisierung durch die Chl-Fluoreszenzintensität $F^{OPE}(t)$, welche nach OPE erhalten wird, hängt $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}(t)$ nur von den durch Wechselwirkungen zwischen Car S₁ und Chl *a* Q_y hervorgerufenen auftretenden Regulationsmechanismen ab. Die sich ändernde Fluoreszenzquantenausbeute der Chlorophylle $\Phi_{F(Chl)}(t)$ verändert den Parameter hingegen nicht. Steigt $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}(t)$ in Experimenten an, so entspricht dies einem Anstieg der Car S₁–Chl-Wechselwirkungen und ein Absinken des Parameters entspricht einer Abnahme der Wechselwirkungen.

In dieser Arbeit werden nur Relativwerte von $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}(t)$ angegeben, da die Absolutwerte nicht mit Zuverlässigkeit bestimmt werden können. Dazu werden die Ausgangswerte des dunkeladaptierten Zustandes auf eins normalisiert und die folgenden Werte entsprechend linear skaliert. Aus Experimenten über die Car S₁–Chl-Energietransfer-Effizienz in verschiedenen Pigment-Protein-Komplexen lässt sich eine grobe Abschätzung über den Wert von $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}(t)$ in Pflanzen treffen. Für LHCII wurde ein Wert von etwa 50 % gefunden^[87] und für PSI von 47 %.^[88] Damit ergibt sich für Pflanzen ein über alle Carotinoide und Proteine gemittelter Wert für die Car S₁–Chl-Energietransfer-Effizienz, der in der Größenordnung von etwa 50 % liegt.

Dabei tragen auch unterschiedliche Carotinoid-Spezies zum gemessenen Wert des Parameters in unterschiedlichem Ausmaß bei. Der Energiefluss hängt dabei von der energetischen Differenz der beteiligten angeregten Zustände ab. Wenn die Energiedifferenz sehr groß ist, kommt es eher zu einem Energietransfer^[89] auf das tiefer liegende Energieniveau. Bei energetisch vergleichbaren Energieniveaus kommt es hingegen eher zur Ausbildung von exzitonischen Wechselwirkungen (s. Kapitel 2.8).^[90, 91] Bei kleinen Distanzen zwischen den Pigmenten

kommt es auch bei dipolverbotenen Zuständen wie Car S₁ und Chl *a* Q_y zu ausgeprägten Kopplungen.^[92]

3.5 Absorptionsspektrometer

Die Absorptionsmessungen wurden mit einem Lambda 9 UV/VIS/IR Spektrometer der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Zur Verwendung kamen Quarzküvetten aus SUPRASIL® der Firma Hellma. Die Hintergrundkorrektur erfolgte gegen eine Referenzküvette mit dem verwendeten Puffer.

3.6 Probencharakterisierung

3.6.1 Isolierte Lichtsammelproteine

Die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten isolierten Lichtsammelproteine erfolgte durch Dr. Tiago Barros und Laura Wilk aus der Arbeitsgruppe um Prof. Kühlbrandt vom Max Planck Institut für Biophysik in Frankfurt. Zur Bestimmung des Beitrages der Xanthophyllzyklus-Carotinoide wurden zwei unterschiedliche Arten von Proben erzeugt. Während die ersten nur Vio enthalten, sind die zweiten mit Zea angereichert.

Zur Gewinnung der LHCII-Proben wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet. Im ersten^[93, 94] wurden native LCHII-Proteine aus Erbsen isoliert. Die Erbsen wurden dazu in einem Standardnährboden gezüchtet. Dabei wurden sie jeden Tag einer 16 stündigen Beleuchtungsperiode ausgesetzt und die Pflanzen nach zwei Wochen geerntet. Die Blätter wurden gewaschen und in einen Mixer in einer Lösung aus 0,1 M Na-Tricin (pH = 7,8) und 0,4 M Sorbitol zerkleinert. Durch Filtration und anschließende Zentrifugation mit 1000 g für 10 Minuten wurde ein Chloroplasten-Niederschlag erhalten.

Die Chloroplasten wurden in eine Lösung aus 1 mM Tricin, 10 mM NaCl und 5 mM EDTA (pH = 7,8) gegeben, wodurch ein osmotischer Schock erfolgte, durch den die Chloroplasten zerstört wurden. Anschließend wurden sie in einer Lösung aus 5 mM EDTA und 0,1 M Sorbitol (pH = 7,8) gewaschen.

Die Abtrennung der LHCII-Fraktion erfolgte durch einen Saccharose-Gradienten mit 0,05 % Triton X-100.^[95] Über Spektren, die vor und nach der Prozedur aufgenommen wurden, konnten photo-oxidative Prozesse ausgeschlossen werden.

Das zweite Verfahren ^[96, 97] kam sowohl zur Herstellung von rekonstituierten LHCII-Proben als auch zur Bereitstellung von rekonstituierten Chlorophyll-Proteinen CP24, CP26 und CP29 zur Verwendung. Dazu wurden die entsprechenden Apoproteine von *A. thaliana* (s. Kapitel 3.6.3) in *Escherichia coli*. (*E. coli*) exprimiert. Die Polypeptide bildeten während der Expression Einschlusskörperchen, welche isoliert und nach Plumley *et al.* aufgereinigt wurden.^[98] Die Chlorophylle wurden per Extraktion mit Aceton aus Spinat gewonnen und die Carotinoide per anschließender Fällungsreaktion mit Dioxan. Die Rückfaltung erfolgte schließlich aus den aufgereinigten Einschlusskörperchen nach der Methode von Paulson *et al.*^[99] Zur Anreicherung mit Zea wurden die rückgefalteten Proteine mit Zea in Ethanol inkubiert.

Die fertigen Proben wurden mittels einer HPLC-Säule der Fima Phenomenex (Synergi Hydro-RP) charakterisiert (s. Tab. 1 und Tab. 2). Dabei wurde die Pigmentzusammensetzung pro Monomer nach der Methode von Gilmore *et al.* errechnet.^[100]

Tab. 1: Mit HPLC ermittelte Probenzusammensetzung eines Proteinmonomers von LHCII.

Pigment	LHCII (nativ)		LHCII (rekonstituiert)	
	Vio angereichert	Zea angereichert	Vio angereichert	Zea angereichert
Neoxanthin	0,91	0,94	0,71	0,75
Violaxanthin	0,53	0,28	0,21	0,20
Antheraxanthin	0	0,07	0	0
Lutein	2,27	2,43	2,21	1,94
Zeaxanthin	0	0,14	0	0,36
Chl b	6,04	6,08	5,37	5,71
Chl a	7,96	7,92	8,63	8,29

Tab. 2: Mit HPLC ermittelte Probenzusammensetzung eines Proteinmonomers der Chlorophyll-Proteine.

Pigment	CP24		CP26		CP29	
	Vio angereichert	Zea angereichert	Vio angereichert	Zea angereichert	Vio angereichert	Zea angereichert
Neoxanthin	0	0	0,89	0,85	0,62	0,60
Violaxanthin	0,97	0,77	0,10	0,08	0,46	0,39
Antheraxanthin	0	0	0	0	0	0
Lutein	1,13	0,81	1,38	1,27	0,83	0,70
Zeaxanthin	0	0,71	0	0,23	0	0,25
Chl b	4,97	5,32	2,86	2,90	2,02	2,19
Chl a	5,02	4,68	6,14	6,10	5,97	5,81

3.6.2 Messungen bei verschiedenen pH-Werten

Für die Messungen im pH-Bereich von 5,5-6,5 wurden die Proben in einem wässrigen Puffer aus 50 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) und 0,3 % β -Nonyl β -D-glucopyranosid (NG) verdünnt. Bei dem pH-Wert von 7,5 wurde hingegen 50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) anstelle von MES verwendet. Vor dem Verdünnen der Probe wurde sie mittels NaOH auf den gewünschten pH-Bereich eingestellt. Ein pH-Meter von Hanna-Instruments (HI991001) wurde zur Kontrolle der pH-Werte verwendet.

Um Verfälschungen durch Effekte wie Reabsorption zu verhindern, wurden alle Proben vor der Messung auf gleiche optische Dichte verdünnt (OD = 0,3 bei 678 nm).

3.6.3 Pflanzenmutanten

Für die Experimente wurden *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) Wildtyp-Pflanzen sowie die *lut2*-, *WT+PsbS*-, *npq4*-, *npq1*- und *npq2*-Mutanten verwendet. *A. thaliana* hat den Vorteil, dass sie einen relativ kurzen Generationszyklus besitzt, wodurch es möglich ist, in kurzen Zeiträumen genetische Veränderungen an der Pflanze durchzuführen. Da sie zudem eine vergleichbare Physiologie wie höhere Pflanzen besitzt, hat sie sich zu einem Modellsystem der Photosyntheseforschung etabliert, von der unterschiedlichste Mutanten zur Verfügung stehen, die Einblicke in den Photosyntheseapparat ermöglichen.^[101]

Die *npq1*- und *npq2*-Mutanten haben einen defekten Xanthophyllzyklus, so dass sich in den *npq1*-Mutanten Vio und in den *npq2*-Mutanten Zea ansammelt und keine Umwandlung stattfinden kann.^[102] Der *lut2*-Mutant verfügt über kein Lutein, da er aufgrund eines defekten Enzymes den gesamten rechten Synthese-Ast in Abb. 18 nicht beschreiten kann.^[103] Die Lutein-Positionen werden daher von anderen Carotinoiden besetzt. Die *npq4*- und *WT+PsbS*-Mutanten besitzen schließlich unterschiedliche Mengen an dem Protein PsbS.^[45, 104] Während *WT+PsbS* das Protein überexprimiert, ist der *npq4*-Mutant durch einen Gendefekt nicht in der Lage, das Protein zu exprimieren. Durch Vergleiche der Messergebnisse der Mutanten untereinander und mit dem Wildtyp lassen sich leicht Rückschlüsse über die Bedeutung der Carotinoide und von PsbS *in vivo* ziehen.

Die *A. thaliana Col-0* Wildtyp-Pflanzen und die *lut2*-, *npq4*- und *WT+PsbS*-Mutanten wurden durch Krishna K. Niyogi (University of California, Berkeley) zur Verfügung gestellt. Die Pflanzen wurden in nährstoffarmer Erde bei Lichtintensitäten von $80 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, einer konstanten Temperatur von 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % aufge-

zogen. Zum Wachstum wurden Kurztagbedingungen verwendet, was 10 Stunden Licht und 14 Stunden Dunkelheit entspricht.

Die *npq1*- und *npq2*-Mutanten wurden zusammen mit weiteren Wildtyp-Pflanzen vom NASC (European Arabidopsis Stock Center) gekauft. Die Aufzucht erfolgte ebenso wie die der oben erläuterten Pflanzen. Jedoch wurden bei dieser Wachstumsreihe Langtagbedingungen (14 Stunden Licht, 10 Stunden Dunkelheit) mit Lichtintensitäten von $200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angewendet.

4 Ergebnisse

4.1 Einführung

Bei der Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung (TPE) der Carotinoide wurde darauf geachtet, dass keine Ein-Photonen-Anregungs-(OPE)-Anteile die Messungen verfälschen. Dazu wurde die Anregungsintensität mittels eines variablen *Neutral Density*-Filters variiert und die Fluoreszenzintensität nach TPE der Proben gemessen (s. Abb. 35). Die erhaltene quadratische Abhängigkeit zeigt klar das Vorliegen von TPE.^[105]

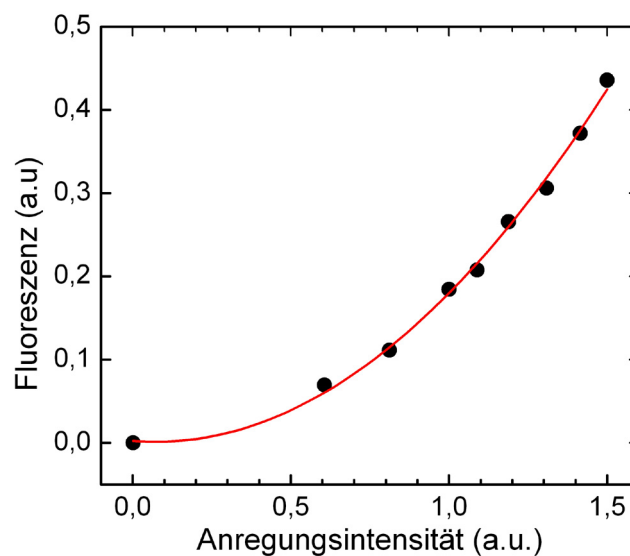


Abb. 35: Die quadratische Abhängigkeit von Anregungsintensität und emittierter Fluoreszenz zeigt klar das Vorliegen von TPE der Carotinoide.^[9]

Während das *Measuring Light* des PAM eine Zentralwellenlänge von 594 nm aufweist, welche die OPE der Q_y -Bande der Chlorophylle ermöglicht, wurde am OPA eine *Idler*-Wellenlänge von 1188 nm eingestellt. Diese ermöglicht die Anregung der dunklen S_1 -Niveaus der Carotinoide (s. Abb. 36). Darüber hinaus ist die TPE-Wellenlänge von 1188 nm energetisch äquivalent zu der OPE-Wellenlänge ($\lambda_{\text{Exc}}/2 \sim 594 \text{ nm}$). Somit werden energetisch gleiche Level der photosynthetischen Komplexe angeregt, wodurch eine direkte Beobachtung der Wechselwirkungen der Chl-Zustände und der Car S_1 -Zustände möglich wird, ohne vorgelagerte Energietransferprozesse in die Betrachtung mit einbeziehen zu müssen.

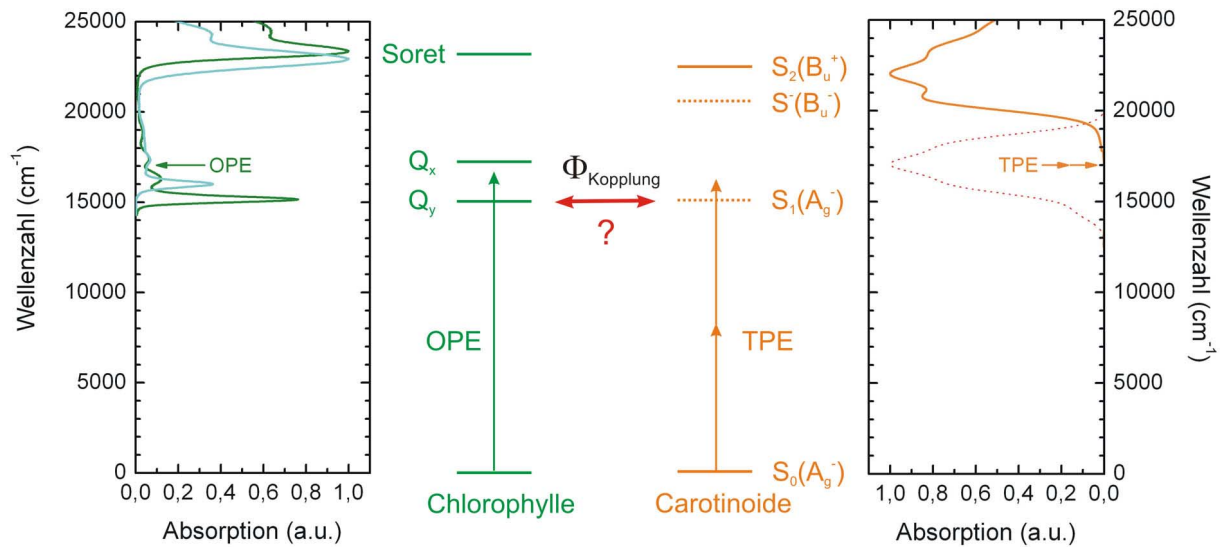


Abb. 36: Lage der Energieniveaus der Chlorophylle und Carotinoide (am Beispiel von β -Carotin) und die in den Experimenten verwendeten Anregungsenergien (frei nach ^[55]).

Zudem ist für die gewählten Wellenlängen und Pulsintensitäten durch Vergleich der Zwei-Photonen-Absorptionsspektren von Carotinoiden in Pigment-Protein-Komplexen und Zwei-Photonen-Absorptionsspektren von Chlorophyll in Lösung bekannt, dass weniger als 5 % direkte Anregung der Chlorophylle im Vergleich zur selektiven Anregung des Car S₁-Niveaus auftritt (s. Abb. 37). ^[11, 51, 52]

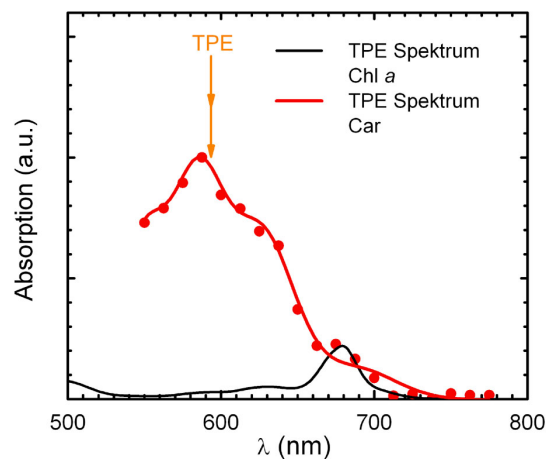


Abb. 37: Vergleich der Zwei-Photonen-Absorptionsspektren von Chlorophyll in Lösung und in Pigment-Protein-Komplexen gebundenen Carotinoiden. Zusätzlich ist die verwendete TPE-Wellenlänge eingezeichnet. ^[9]

Vor den eigentlichen Fluoreszenzmessungen an den mit Vio bzw. Zea angereicherten LHCII-Proben (s. Kapitel 3.6.1), wurde zudem über eine Verdünnungsreihe sichergestellt, dass im gewählten Konzentrationsbereich die Fluoreszenzintensität der angesetzten Proben proportional zur Konzentration ist. Dadurch konnte verhindert werden, dass Effekte wie Reabsorption auftreten, die die Messungen verfälschen würden.

4.1.1 Ergebnisse

Zunächst wurden die Wechselwirkungen zwischen Car S_1 und Chl Q_y im wichtigsten Pigment-Protein-Komplex LHCII (s. Kapitel 2.3.2.1) untersucht. Um die Fluoreszenzen beider Proben miteinander vergleichen zu können, wurden sie auf die gleiche Konzentration von OD = 0,3 bei der Q_y -Bande mit einem TRIS-Puffer (s. Kapitel 3.6.1) verdünnt (s. Abb. 38).

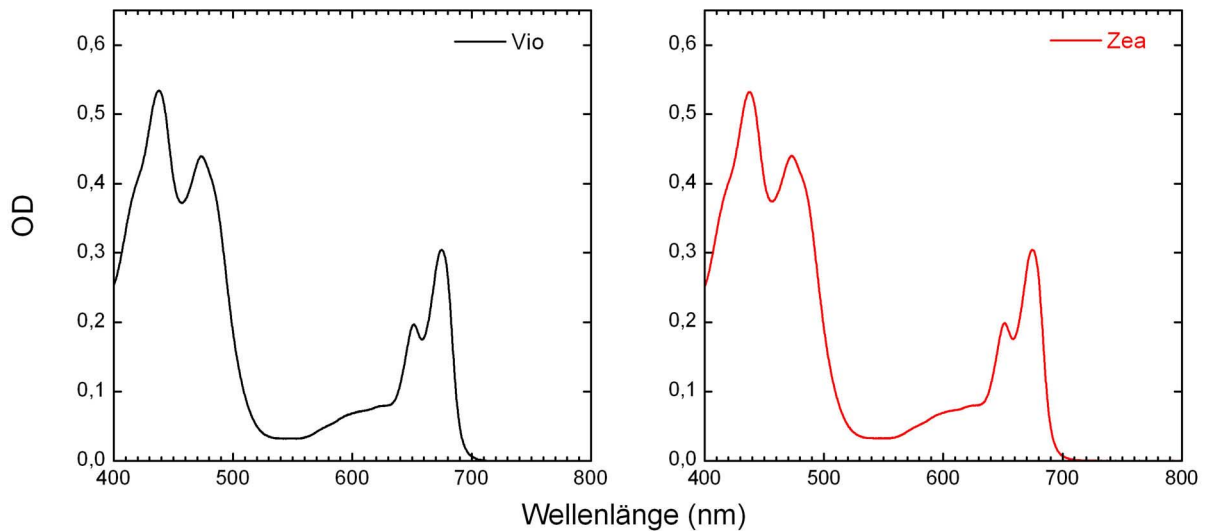


Abb. 38: **links:** Absorptionsspektrum der bei der Messung untersuchten Lösung von mit Vio angereicherten LHCII. **rechts:** Absorptionsspektrum der mit Zea angereicherten LHCII-Probe.

Die so vorbereiteten Proben wurden anschließend mit dem entwickelten Messaufbau (s. Kapitel 3.3) fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Aus den gemessenen Fluoreszenzen F^{OPE} und F^{TPE} wurde nach Gl. (21) der Parameter $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}$ ermittelt. Die Ergebnisse für die Messungen an nativen und rekonstituierten Lichtsammelkomplexen sind in Abb. 39 dargestellt. Sie wurden an je vier voneinander unabhängigen Proben an unterschiedlichen Tagen erhalten. Wie in Kapitel 3.4 erklärt, wurde der mittlere Wert $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}$ der mit Vio angereicherten Probe auf eins normalisiert (schwarze Balken) und die zugehörigen Werte der mit Zea angereicherten Proben linear skaliert (rote Balken).

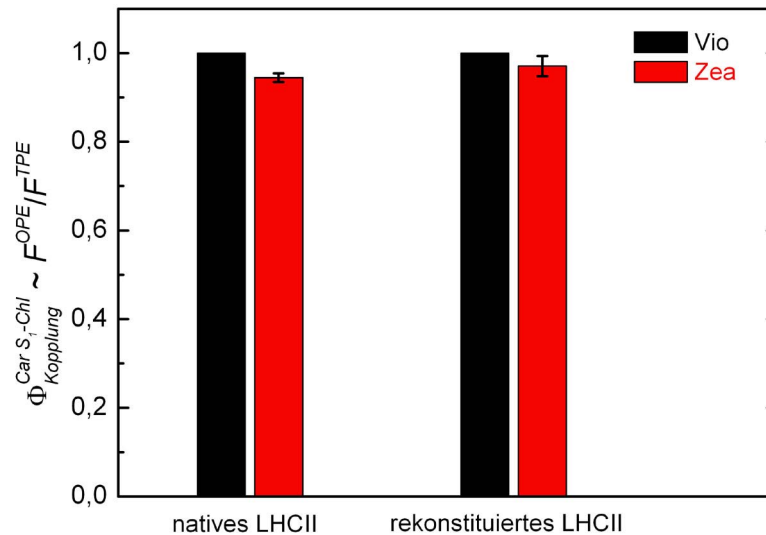


Abb. 39: Darstellung der Wechselwirkungsparameter $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_1\text{-Chl}}$ in unterschiedlich erzeugten LHCII-Proben, die entweder ausschließlich Vio enthielten (schwarz) oder mit Zea angereichert wurden (rot).^[55]

Sowohl für native als auch für rekonstituierte Proben ergeben sich leicht niedrigere $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_1\text{-Chl}}$ -Werte für die mit Zea angereicherten Proben. Sie erreichen lediglich 94,5 % bzw. 97 % der entsprechenden Werte der Vio-Probe. Interessant ist die Beobachtung, dass die Unterschiede auch bei einem nicht kompletten Austausch der Xanthophylle auftreten, was durch die Ergebnisse der nativen Proben gezeigt wird, die nur gering mit Zea angereichert waren (s. Kapitel 3.6.1).

In lebenden Organismen liegen die LHCII-Komplexe nicht isoliert in Lösung vor, sondern sind in die Thylakoidmembran eingebettet und von anderen Komplexen umgeben. Zudem sind sie zusätzlichen externen Einflüssen wie pH-Variationen ausgesetzt. Daher wurden die nativen LHCII-Proben in einem nächsten Experiment unter Bedingungen untersucht, von denen bekannt ist, dass sie zu einem *Quenchen* der Fluoreszenz führen. So ist z. B. bekannt, dass die Veränderung des pH-Wertes einen starken Einfluss auf das *Quenching*-Verhalten von LHCII haben kann.^[106] Darüber hinaus wurde eine Beeinflussung des *Quenchings* durch die Anwesenheit von Zea festgestellt.^[107]

Die mit Vio und Zea angereicherten Proben wurden daher mit einem MES-Puffer (s. Kapitel 3.6.2) bei verschiedenen pH-Werten in gleicher Weise wie im ersten Experiment untersucht. Die Einstellung von gleichen Konzentrationen erfolgte wie zuvor beschrieben durch Verdünnung auf gleiche optische Dichten der Q_y -Banden. Zusätzlich wurden die bereits durchgeführten Messungen bei pH = 7,5 zur Vergleichbarkeit wiederholt und weitere Messungen bei pH-Werten von 6,5, 6,0 und 5,5 vorgenommen. Die Messungen wurden an drei voneinander

unabhängigen Proben an drei verschiedenen Tagen durchgeführt, wobei jeweils Messungen an den mit Vio bzw. Zea angereicherten Proben bei allen pH-Werten erfolgten. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 40 dargestellt. Zur Fokussierung auf die durch die pH-Veränderungen hervorgerufenen Dynamiken wurden die bei pH = 7,5 erhaltenen Werte von F^{OPE} (linke Abbildung) und F^{TPE} (mittlere Abbildung) der mit Vio sowie der mit Zea angereicherten Proben auf eins normalisiert und die anderen pH-Werte linear skaliert. Der Parameter $\Phi_{Kopplung}^{Car S_I-Chl}$ (rechte Abbildung) wurde wiederum nach Gl. (21) berechnet.

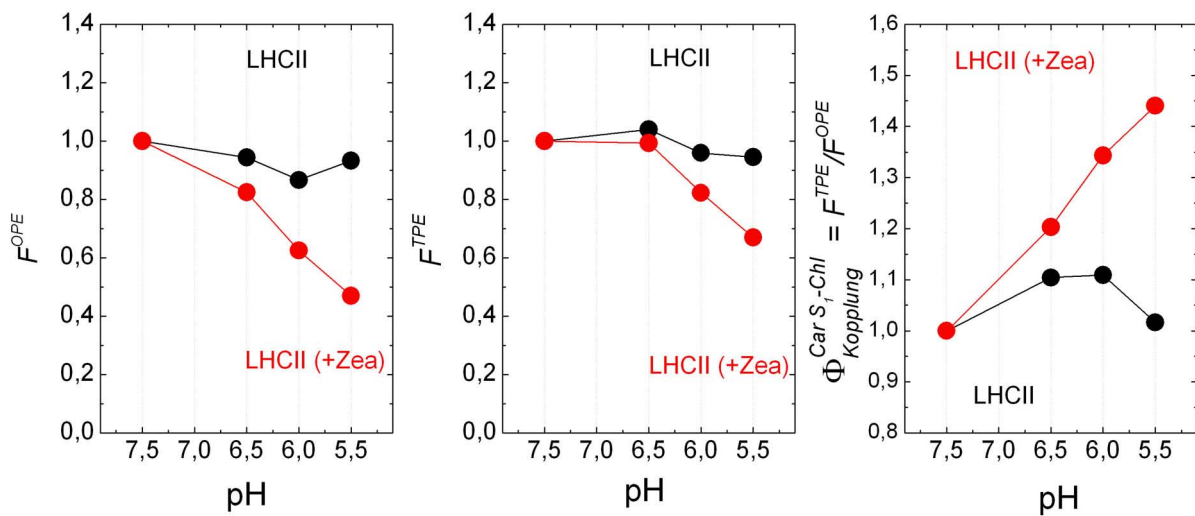


Abb. 40: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung nach OPE (**links**) und TPE (**Mitte**) an LHCII-Proben, die entweder mit Vio (schwarz) oder mit Zea (rot) angereichert wurden. **rechts:** Darstellung des aus den beiden Fluoreszenzen ermittelten Wechselwirkungsparameters $\Phi_{Kopplung}^{Car S_I-Chl}$ in Abhängigkeit vom pH-Wert.^[9]

Bei diesen Messungen ergeben sich eindeutige Unterschiede zwischen den mit Vio bzw. Zea angereicherten Proben. Unter den gewählten Bedingungen fällt F^{OPE} bei den mit Zea angereicherten Proben bis auf etwa 50 % ab, wenn der pH-Wert bis auf 5,5 abgesenkt wird. Für die nur Vio enthaltenen Proben ergeben sich keine deutlichen Veränderungen bei Variation der pH-Werte. Der Wechselwirkungsparameter $\Phi_{Kopplung}^{Car S_I-Chl}$ steigt für die mit Zea angereicherten Proben bei Absenkung des pH-Wertes um etwa 45 % an. Auch für diesen Parameter ergeben sich bei den Vio-Proben kaum Unterschiede bei pH-Variationen.

Um das *Quenchen* der Fluoreszenz F^{OPE} vergleichbar zu den Pflanzen zu quantifizieren (s. Kapitel 3.2), wurde der NPQ-Parameter ähnlich wie für Pflanzen nach Gl. (20) berechnet. Dabei wurden die maximale, bei pH = 7,5 erreichte Fluoreszenz für den Wert von F_m und die Fluoreszenzen bei anderen pH-Werten jeweils für F_m' eingesetzt. Die sich ergebenden NPQ-

Werte wurden mit dem Parameter $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_1\text{-Chl}}$ in Abb. 41 gegeneinander aufgetragen, um sie auf Korrelationen zu untersuchen.

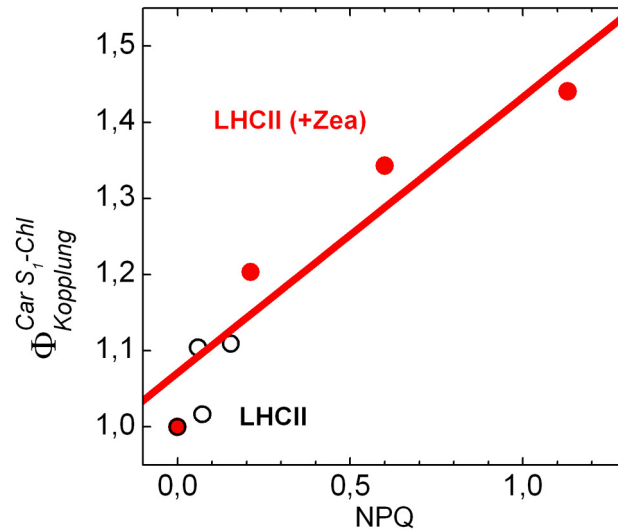


Abb. 41: Auftragung der Veränderung des Wechselwirkungsparameters $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_1\text{-Chl}}$ in Relation zum gestiegenen *Quenching*-Parameter NPQ, welcher mittels Gl. (20) ermittelt wurde. Bei den mit Zea angereicherten Proben (rote Punkte) ergibt sich eine hohe Dynamik und eine eindeutige Korrelation im Gegensatz zu den mit Vio angereicherten Proben (schwarze Kreise).^[9]

Für die mit Zea angereicherten LHCII-Proben (rote Punkte in Abb. 41) ergibt sich eine eindeutige Korrelation zwischen den Car S_1 -Chl-Wechselwirkungen und dem Fluoreszenz-*Quenching* NPQ, während die Werte der mit Vio angereicherten Proben nahezu unverändert bleiben. Doch auch die Werte der mit Vio angereicherten Proben orientieren sich an der Regressionsgeraden (schwarze Kreise in Abb. 41).

Um zu klären, welche Ursachen das unterschiedliche Verhalten von LHCII-Proben mit und ohne Zea hat, wurden die zur Konzentrationsbestimmung erhaltenen Absorptionsspektren der Proben näher untersucht. Eine mögliche Erklärung der Steigerung von $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_1\text{-Chl}}$ sind exzitatorische Wechselwirkungen. Diese würden sich durch eine Verschiebung der Absorptionsspektren in den roten Wellenlängenbereich zeigen, da mit den Wechselwirkungen eine Verringerung der Energielevel einhergeht (vergl. auch Abb. 27).

Die Absorptionsspektren der Proben mit und ohne Zea bei den unterschiedlichen pH-Werten sind in Abb. 42 dargestellt. Um eine eventuelle Rotverschiebung festzustellen und die minimalen Konzentrationsunterschiede als Fehlerquelle auszuschließen, wurden alle Kurven auf eine optische Dichte von 0,3 bei der Q_y -Bande normalisiert. Tatsächlich zeigen sich bei den mit Zea angereicherten Proben kleine Unterschiede im Bereich der Q-Banden (etwa 683 nm)

und im Bereich der S_2 -Banden (etwa 550 nm) bei den verschiedenen Absorptionsspektren, während bei den Vio-Proben keine offensichtlichen Veränderungen zu beobachten sind.

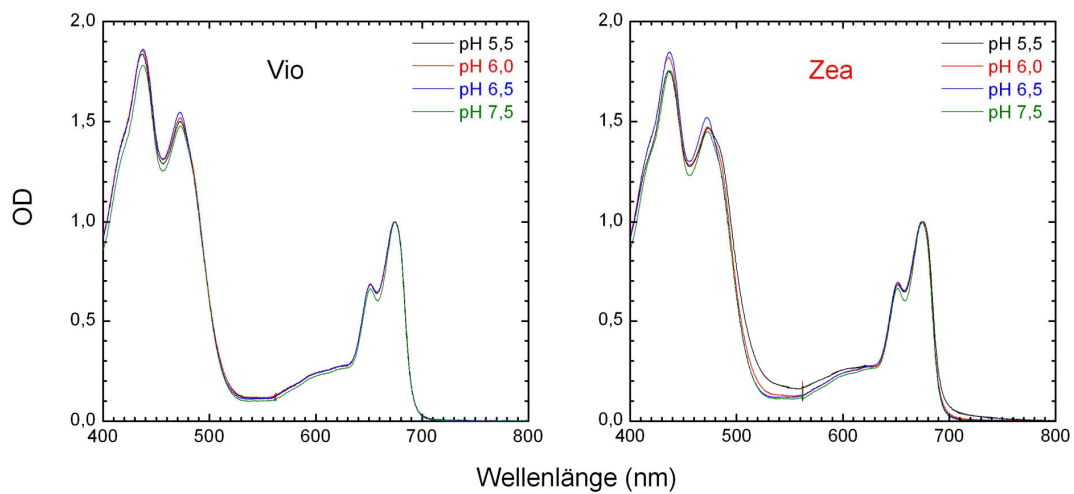


Abb. 42: Absorptionsspektren der pH-Wert abhängigen Messungen an LHCII. Die Spektren wurden auf gleiche OD-Werte der Q_y -Banden normalisiert, um minimale Abweichungen der eingestellten Konzentrationen auszugleichen. **links:** mit Vio angereicherte Proben. **rechts:** mit Zea angereicherte Proben.^[9]

Zum genaueren Vergleich wurden Differenzspektren der einzelnen Absorptionsspektren erstellt (s. Abb. 43). Dazu wurde von den Spektren der niedrigeren pH-Werte das Absorptionsspektrum bei pH = 7,5 abgezogen. Deutlich ist bei den Zea-Proben das Auftreten von höherer Absorption bei 683 nm und bei 500 nm zu sehen. Der Bruch bei etwa 560 nm wurde durch einen Lampenwechsel am verwendeten Absorptionsspektrometer hervorgerufen und hat keine physikalische Bedeutung.

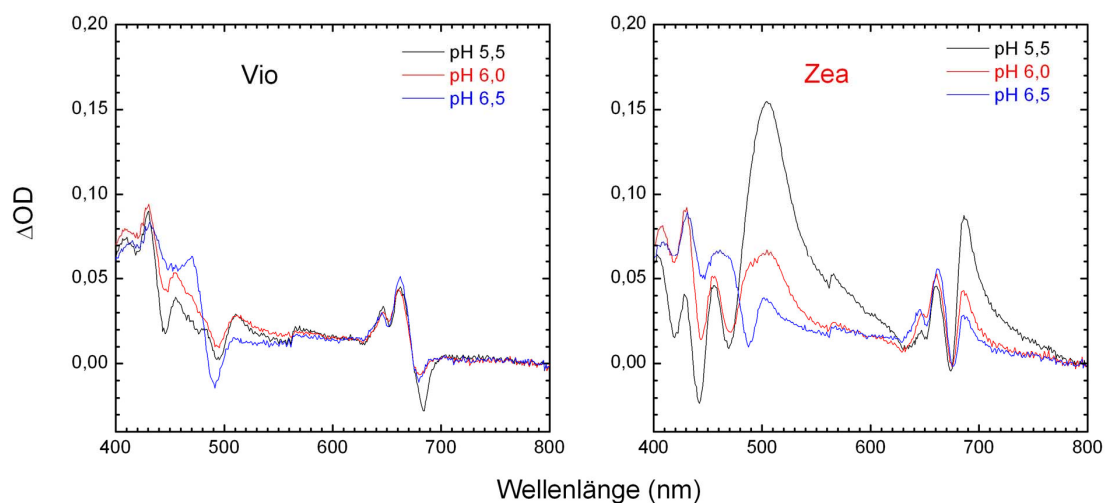


Abb. 43: Differenzspektren der Absorptionsmessungen an LHCII bei verschiedenen pH-Werten. **links:** mit Vio angereicherte LHCII-Proben. **rechts:** mit Zea angereicherte LHCII-Proben. Deutlich ist das Auftreten von Rotverschiebungen der Q_y - und Soret-Absorptionsbanden bei niedrigen pH-Werten zu sehen.^[9]

Eine interessante Beobachtung ist der Anstieg der Absorption bei 683 nm bei sinkendem pH-Wert. Das Ausmaß der Rotverschiebung der Chl *a* Q_y -Banden nimmt also bei Verringerung des pH-Wertes zu. Da für die niedrigeren pH-Werte verstärktes *Quenchen* ermittelt wurde (s. Abb. 40 links), wurde zusätzlich eine Auftragung der Höhe der Differenzbande bei 683 nm gegen NPQ für die Messungen bei verschiedenen pH-Werten vorgenommen (s. Abb. 44). Zwischen Ausmaß der Rotverschiebung und NPQ zeigt sich bei den mit Zea angereicherten Proben eine eindeutige Korrelation.

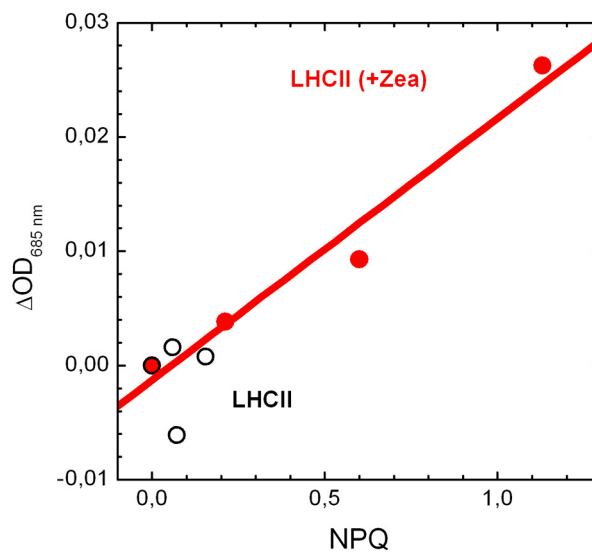


Abb. 44: Darstellung der Zunahme der Differenzabsorption bei 683 nm bei unterschiedlichen pH-Werten im Vergleich zur Zunahme des NPQ-Parameters welcher mittels Gl. (20) ermittelt wurde. Bei den mit Zea angereicherten Proben (rote Punkte) ergibt sich erneut eine eindeutige Korrelation, während die mit Vio angereicherten Proben keine Veränderung zeigen (schwarze Kreise).^[9]

4.1.2 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass ein einfacher Austausch von Vio durch Zea in LHCII, wie er im Rahmen des Xanthophyll-Zyklus abläuft, alleine nicht genügt, um große Veränderungen der Interaktionen zwischen Car S_1 und Chl Q_y hervorzurufen. In Anwesenheit von Zea ist der Wechselwirkungsparameter $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_1 - \text{Chl}}$ lediglich um einen kleinen Betrag niedriger, als in den mit Vio angereicherten LHCII-Proben. Beim Wechsel auf Zea bilden sich folglich keine exzitonischen Wechselwirkungen oder Verschiebungen der Energieniveaus aus. Daher können weder Energiesenken entstehen noch eine Veränderung des Energietransfers auftreten. Dies betrifft sowohl native, als auch rekonstituierte Proben, mit unterschiedlichen Gehalten an Zea. Frühere Experimente haben zudem gezeigt, dass auch keine Veränderung des Energie-

transfers von Chl auf Car S₁ beobachtet werden kann, wie durch Aufnahme von Fluoreszenz-lebenszeitkurven von beiden Proben bestätigt wurde.^[48]

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Amarie *et al.*, die zeigen konnten, dass die Konzentration von Carotinoid-Radikal-Kationen in LHCII-Proben, die mit den hier verwendeten vergleichbar sind, nicht wesentlich voneinander abweichen. Da diesen Radikal-Kationen eine Beteiligung im Rahmen des NPQ zugeschrieben wird, wurde geschlussfolgert, dass LHCII nicht der Ort des *Quenchens* sein kann.^[108]

Durch Veränderung des pH-Wertes konnte jedoch eine Abhängigkeit der Wechselwirkungen von der Xanthophyll-Zusammensetzung gezeigt werden. Es werden verstärkte Car S₁–Chl-Wechselwirkungen detektiert, die nur unter *Quenching*-Bedingungen auftreten. Für diesen Prozess scheint Zea eine besondere Rolle zu spielen, da die entsprechenden Veränderungen bei den mit Vio angereicherten Proben nicht festgestellt werden können. Die gestiegenen Car S₁–Chl-Wechselwirkungen bei gleichzeitiger Ausbildung von rotverschobenen Chl-Absorptionsbanden in LHCII, die nur bei Anwesenheit von Zea auftreten, lassen darauf schließen, dass unter diesen Bedingungen, in denen auch die Fluoreszenz verstärkt *gequencht* wird, exzitonische Zustände entstehen. Diese Zustände sollten effektiv zum Schutz der Pflanzen durch Aufnahme von überschüssiger Energie beitragen.^[109]

Die Art und Weise, wie die veränderten pH-Bedingungen Einfluss auf die Proben haben, sind dabei jedoch noch nicht aufgeklärt. Durch Arbeiten von Wentworth *et al.* und Arab *et al.* konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von rotverschobenen Absorptionsbanden in LHCII an die Ausbildung von Oligomerisierung geknüpft ist.^[107, 110] Es besteht also die Möglichkeit, dass exzitonische Car S₁–Chl-Wechselwirkungen durch Interaktion zwischen LHCII-Trimeren und –Monomeren hervorgerufen werden, wodurch es zum Kontakt zwischen Carotinoiden und Chlorophyllen in der Peripherie der beteiligten Komplexe kommen könnte. Für diesen Prozess könnte Zea eine Katalysatorfunktion zukommen. Ebenso wären pH-Wert induzierte Konformationsänderungen im LHCII und dadurch hervorgerufene Carotinoid-Chlorophyll-Wechselwirkungen denkbar.

Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte treten erst unter pH-Wert induzierten *Quenching*-Bedingungen auf. Somit können Messungen, die nicht unter *Quenching*-Bedingungen durchgeführt werden, nicht den Veränderungen gerecht werden, die *in vivo* zur Regulation führen. Dies könnte auch das von Amarie *et al.* beobachtete Fehlen von Radikal-Kationen in mit Zea angereicherten LHCII-Proben erklären.^[23] Die von dieser Arbeitsgruppe durchgeführten

Messungen wurden nicht unter *Quenching*-Bedingungen durchgeführt und sind somit nicht unmittelbar mit den *in vivo*-Verhältnissen vergleichbar.

Die Stärke der exzitonischen Wechselwirkungen und die Reduzierung der Chlorophyll-Fluoreszenz auf lediglich 50 % des Ausgangswertes, trotz sehr niedrigen Anteils an Zea von lediglich 0,14 Molekülen pro Monomer, sind auf den ersten Blick erstaunlich. Jedoch wurde bereits durch Wentworth *et al.* gezeigt, dass sogar eine einfache Zugabe von Zea in eine Lösung von isolierten LHCII-Monomeren zu einem ähnlichen Effekt führen kann. Auch wurde in dieser Studie eine zusätzliche Absorptionsbande bei 683 nm festgestellt. Bei Untersuchungen der Pigmentzusammensetzung der Proteine nach der Zugabe von Zea ergab sich, dass ein Teil des Zeas vom Protein aufgenommen wurde.^[111]

4.2 Messungen an den kleineren Chlorophyll-Proteinen

4.2.1 Ergebnisse

Da nicht nur für LHCII, sondern auch für die kleineren chlorophyllbindenden Proteine CP24, CP26 und CP29 ein Beitrag zum NPQ festgestellt werden konnte (s. Kapitel 2.3.2.2), wurde überprüft, ob für diese vergleichbare Effekte wie bei LHCII festgestellt werden können. Auch in diesem Fall wurden gleiche Konzentrationen für die mit Vio bzw. Zea angereicherten Proben durch die Aufnahme von Absorptionsspektren eingestellt. Da die vom MPI Frankfurt erhaltenen Proben stark verdünnt waren, wurden in diesem Fall Konzentrationen von OD = 0,24 (für CP29), OD = 0,22 (für CP26) und OD = 0,21 (für CP24) beim Maximum der Q_y -Bande angesetzt (s. Abb. 45).

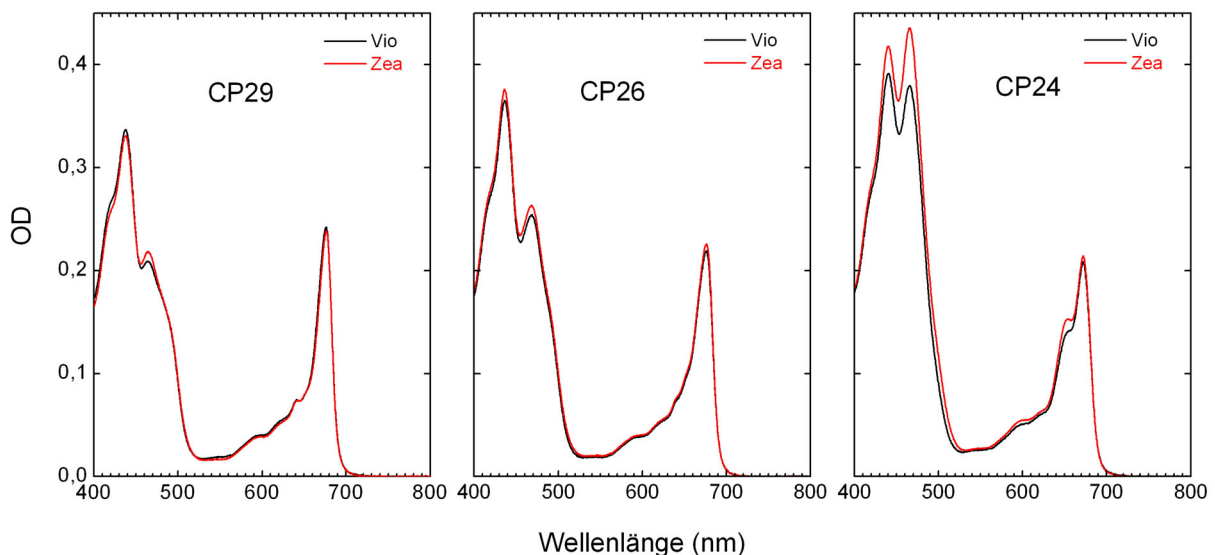


Abb. 45: Absorptionsspektren der kleineren chlorophyllbindenden Proteine. Die Proben wurden entweder mit Vio (schwarz) bzw. Zea (rot) angereichert. **links:** CP29. **Mitte:** CP26. **rechts:** CP24.

Die so vorbereiteten Proben wurden anschließend ebenso wie die LHCII-Proben mit dem neu entwickelten Messaufbau fluoreszenzspektroskopisch untersucht und mit den ermittelten Werten F^{OPE} und F^{TPE} der Parameter $\Phi_{Kopplung}^{Car S_I-Chl}$ nach Gl. (21) errechnet. Die Ergebnisse für die Messungen für die einzelnen chlorophyllbindenden Proteine sind in Abb. 46 dargestellt. Sie basieren auf Experimenten, die an mindestens drei verschiedenen Tagen an voneinander unabhängigen Proben durchgeführt wurden. Der mittlere Wert $\Phi_{Kopplung}^{Car S_I-Chl}$ der mit Vio angereicherten Probe wurde auf eins normalisiert (schwarze Balken) und die zugehörigen Werte der mit Zea angereicherten Proben linear skaliert (rote Balken).

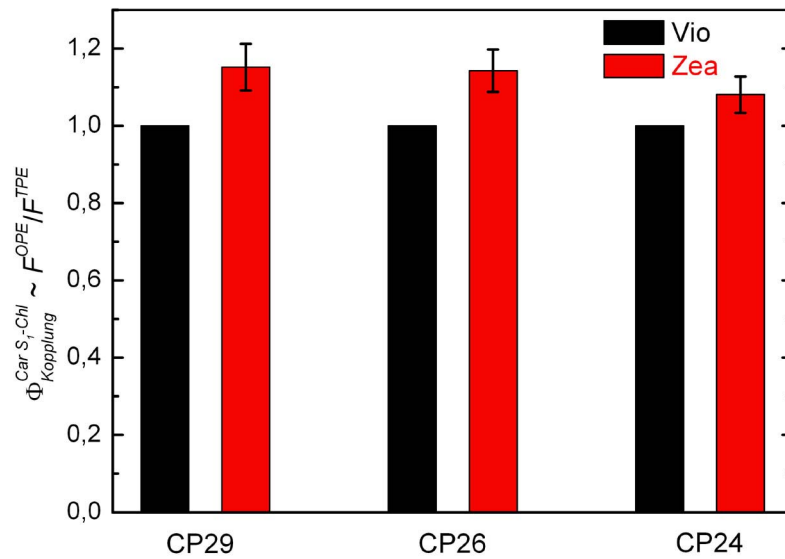


Abb. 46: Darstellung der Wechselwirkungsparameter $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_1\text{-Chl}}$ in den unterschiedlichen kleineren chlorophyllbindenden Proteinen, die entweder mit Vio (schwarz) oder Zea (rot) angereichert waren.

Interessanterweise zeigen diese Proben ein anderes Verhalten als LHCII. So weisen alle mit Zea angereicherten CP-Proben stärkere Wechselwirkungen als die korrespondierenden mit Vio angereicherten Proben auf. Die Abweichungen liegen zudem außerhalb der Fehlergrenzen. Bei CP24 ist der Effekt am wenigsten ausgeprägt, obwohl diese Proben den höchsten Zea-Anteil aufwiesen (s. Kapitel 3.6.1).

Da bei den LHCII-Komplexen eine starke Korrelation zwischen Veränderung des pH-Wertes und den Wechselwirkungen zwischen Car S_1 und Chl festgestellt wurde, wurden äquivalente Messungen an den kleineren Lichtsammelkomplexen CP29 und CP26 durchgeführt. Für die Durchführung von weiteren Messungen an CP24 standen leider keine weiteren Proben zur Verfügung.

Es wurden erneut Messungen von pH = 5,5 bis pH = 7,5 durchgeführt und die korrespondierenden Proben miteinander verglichen. Die Einstellung der Konzentrationen erfolgte wiederum über die optischen Dichten der Q_y -Banden. Dabei musste, im Gegensatz zu den ersten Messungen an den CP, Wert darauf gelegt werden, dass alle Proben von CP29 bzw. CP26 gleiche Konzentrationen von etwa OD = 0,3 bei der Q_y -Bande besitzen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu gewährleisten.

Um ebenso wie bei LHCII den Einfluss des pH-Wertes auf die mit Vio bzw. Zea angereicherten Proben besser abschätzen zu können, wurden die Werte von F^{OPE} (Abb. 47, links) und F^{TPE} (Abb. 47, Mitte) bei pH = 7,5 auf eins normalisiert. Die Ergebnisse bei den anderen pH-

Werten wurden entsprechend linear skaliert. Der Parameter $\Phi_{Kopplung}^{Car\ S_1-Chl}$ (Abb. 47, rechts) wurde nach Gl. (21) aus F^{OPE} und F^{TPE} berechnet.

Da die Messungen bei den pH-Werten 7,5 und 6,0 an einem anderen Tag als die Messungen bei den pH-Werten 5,5 und 6,5 erfolgten, sind die Ergebnisse nicht vollständig miteinander vergleichbar. Daher musste eine weitere Normalisierung vorgenommen werden, um die gesamte pH-Reihe miteinander vergleichen zu können. Dazu wurde das Mittel aller Proben bei pH = 6,0 auf das Mittel aller Proben bei pH = 5,5 und pH = 6,5 normalisiert und der Wert bei pH = 7,5 linear skaliert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 47 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen, die bei LHCII erzielt wurden, decken die y-Achsen die gleichen Bereiche wie in Abb. 40 ab.

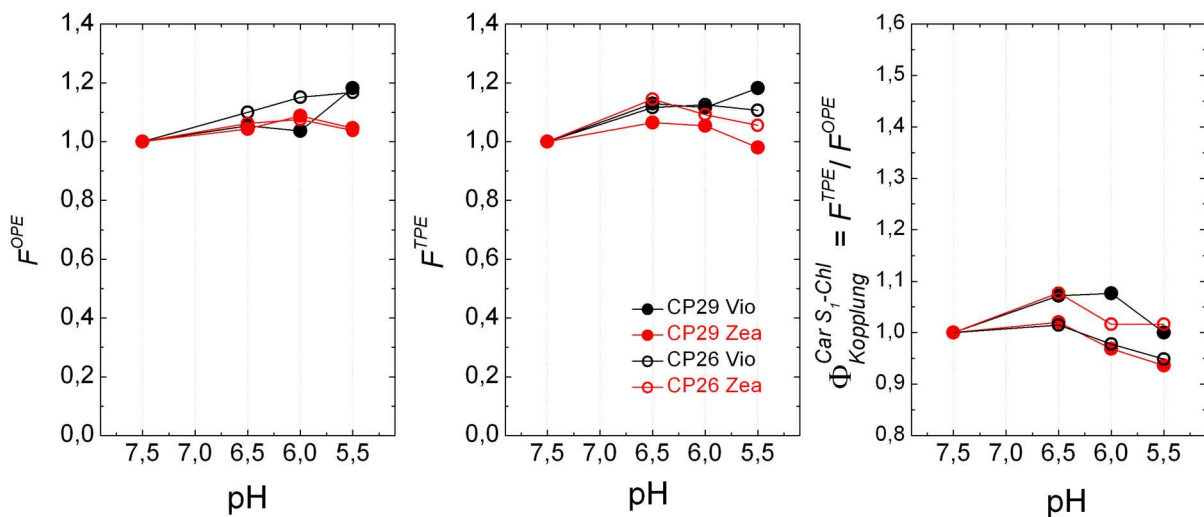


Abb. 47: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung nach OPE (**links**) und TPE (**Mitte**) an Proben der Proteine CP29 (ausgefüllte Kreise) und CP26 (offene Kreise), die entweder mit Vio (schwarz) oder mit Zea (rot) angereichert wurden. **rechts:** Darstellung des aus den beiden Fluoreszenzen ermittelten Wechselwirkungsparameters $\Phi_{Kopplung}^{Car\ S_1-Chl}$ in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Im Gegensatz zu den LHCII-Proben ergibt sich bei den Proben der kleineren chlorophyllbindenden Proteine keine ausgeprägte pH-Abhängigkeit der Stärke der Wechselwirkungen zwischen Car S_1 und Chl (s. Abb. 47, rechts). Insbesondere wird auch kein *Quenching* der Chlorophyll-Fluoreszenz beobachtet (s. Abb. 47 links). Zur Verdeutlichung des Unterschiedes zu den Ergebnissen, die an LHCII gewonnen wurden, wurde zusätzlich eine zu Abb. 41 äquivalente Darstellung der Abhängigkeit zwischen Wechselwirkungsparameter und NPQ erstellt (s. Abb. 48). Dabei wurden gleiche Bereiche der Achsenwerte gewählt, um die Ergebnisse besser mit denen von LHCII vergleichen zu können. Wie zu erwarten, zeigt sich keine Dynamik und keine lineare Korrelation zwischen den beiden Größen.

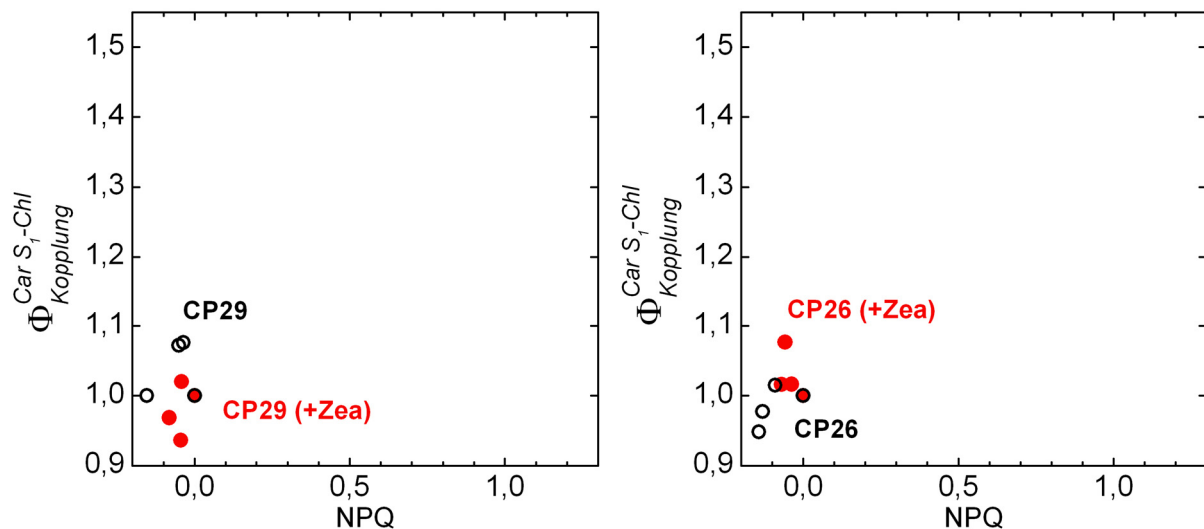


Abb. 48: Auftragung der Veränderung des Wechselwirkungsparameters $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car S}_1\text{-Chl}}$ in Relation zum gestiegenen *Quenching*-Parameter NPQ der Proteine CP29 und CP26, welcher mittels Gl. (20) ermittelt wurde. Im Gegensatz zu den LHCII-Proben (s. Abb. 41) ergibt sich keine Korrelation bei den mit Zea angereicherten Proben.

Zur Untersuchung der Ursachen dieses unterschiedlichen Verhaltens der CP im Vergleich zu LHCII wurde eine nähere Betrachtung ihrer Absorptionsspektren vorgenommen. Dabei wurde zunächst CP29 näher charakterisiert. Zur genauen Vergleichbarkeit wurden die Q_y -Banden auf $\text{OD} = 0,3$ normalisiert (s. Abb. 49). Im direkten Vergleich zu den Absorptionsspektren von LHCII (s. Abb. 42) sieht man, dass sich keine direkt sichtbare Rotverschiebung der Absorptionsspektren bei niedrigen pH-Werten in Anwesenheit von Zea ergibt. Zur genaueren Quantifizierung wurden ebenfalls Differenzspektren aus den niedrigeren pH-Werten und dem bei $\text{pH} = 7,5$ als Referenz gebildet (s. Abb. 50). Der Ausschnitt ist wiederum äquivalent zu den Auswertungen vom LHCII gewählt (s. Abb. 43), um eine direkte Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Es zeigen sich nur minimale Abweichungen zwischen den verwendeten Proben, so dass für CP29 ausgeschlossen werden kann, dass sich exzitonische Wechselwirkungen und damit tiefer liegende energetische Zustände gebildet haben.

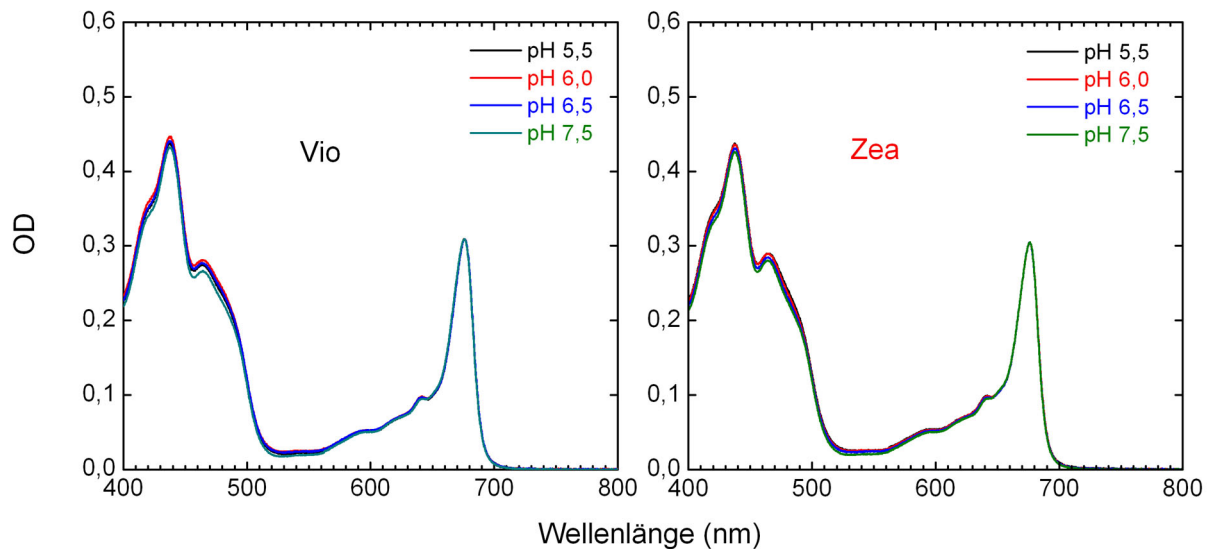


Abb. 49: Absorptionsspektren der pH-Wert abhängigen Messungen an CP29. Die Spektren wurden auf gleiche OD-Werte der Q_y -Banden normalisiert, um minimale Abweichungen der eingestellten Konzentrationen auszugleichen. **links:** mit Vio angereicherte Proben. **rechts:** mit Zea angereicherte Proben.

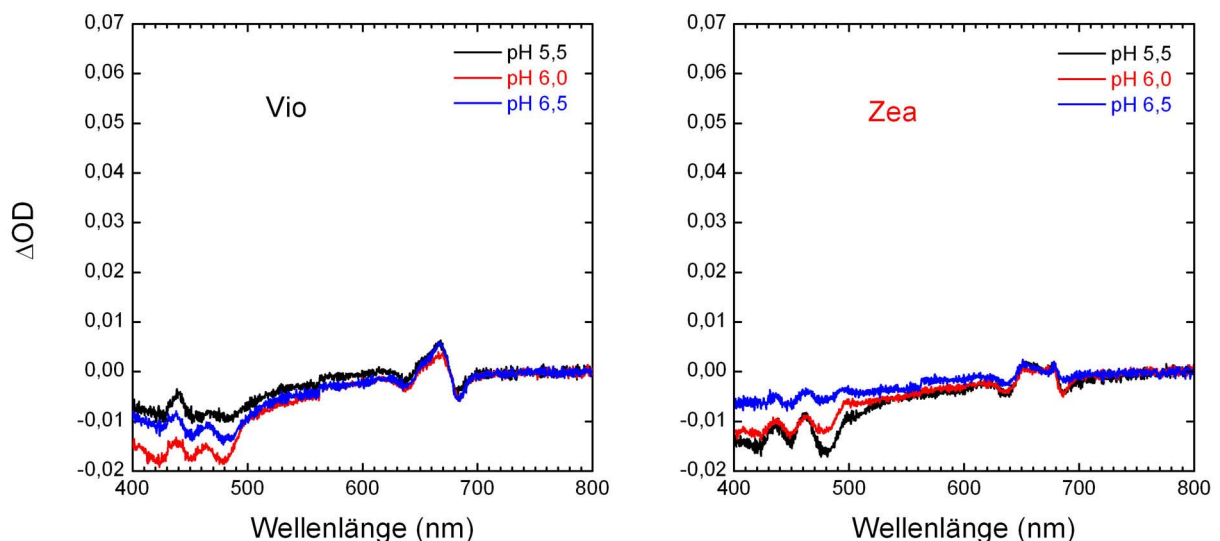


Abb. 50: Differenzspektren der Absorptionsmessungen an CP29 bei verschiedenen pH-Werten. **links:** mit Vio angereicherte Proben. **rechts:** mit Zea angereicherte Proben. Abgesehen von durch das verwendete Absorptionsspektrometer hervorgerufenen Messungenauigkeiten unter 500 nm ergeben sich keine Veränderungen.

Diese Art der Auswertung wurde für CP26 wiederholt, um zu klären, ob sich für diese Proben die gleichen Ergebnisse wie für CP29 zeigen. Zunächst wurden die Absorptionsspektren auf $OD = 0,3$ bei Q_y normalisiert (s. Abb. 51) und in einem nächsten Schritt die Differenzspektren gebildet (s. Abb. 52). Die Ergebnisse sind zu denen von CP29 äquivalent. Es können keine zu LHCII vergleichbaren Rotverschiebungen anhand der Absorptionsspektren beobachtet werden. Jedoch zeigen sich leicht erhöhte optische Dichten in den Differenzspektren im gleichen Bereich wie bei LHCII (bei 683 nm). Diese erreichen jedoch nicht das Ausmaß der Differenz-

peaks von LHCII (s. Abb. 43). Somit kann auch für diese Proben die Ausbildung von ähnlich starken exzitonischen Wechselwirkungen wie in LHCII ausgeschlossen werden.

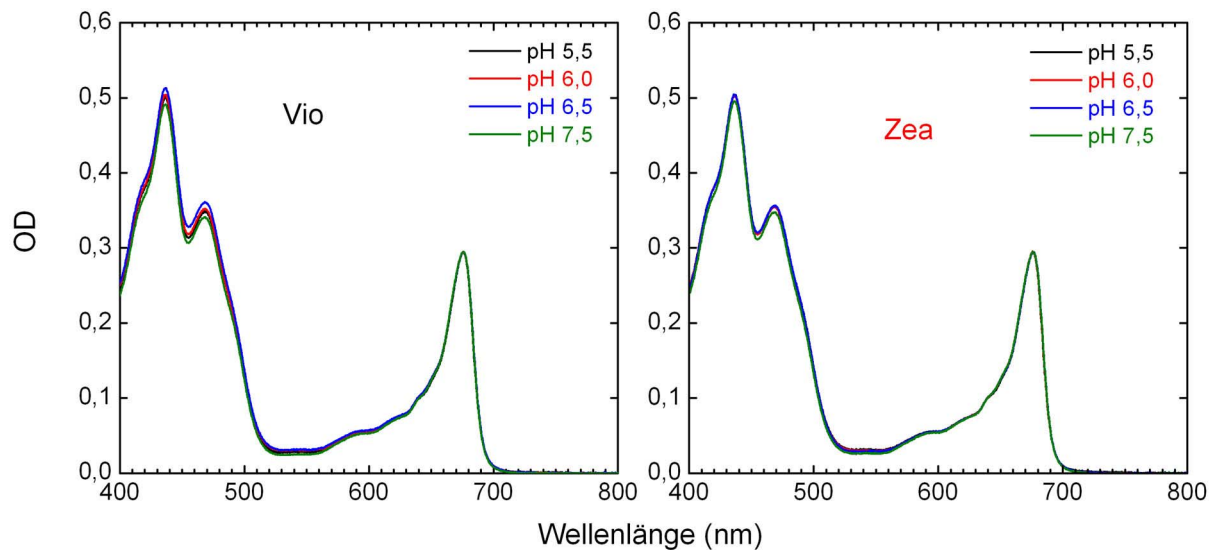


Abb. 51: Absorptionsspektren der pH-Wert abhängigen Messungen an CP26. Die Spektren wurden auf gleiche OD-Werte der Q_y -Banden normalisiert, um minimale Abweichungen der eingestellten Konzentrationen auszugleichen. **links:** mit Vio angereicherte Proben. **rechts:** mit Zea angereicherte Proben.

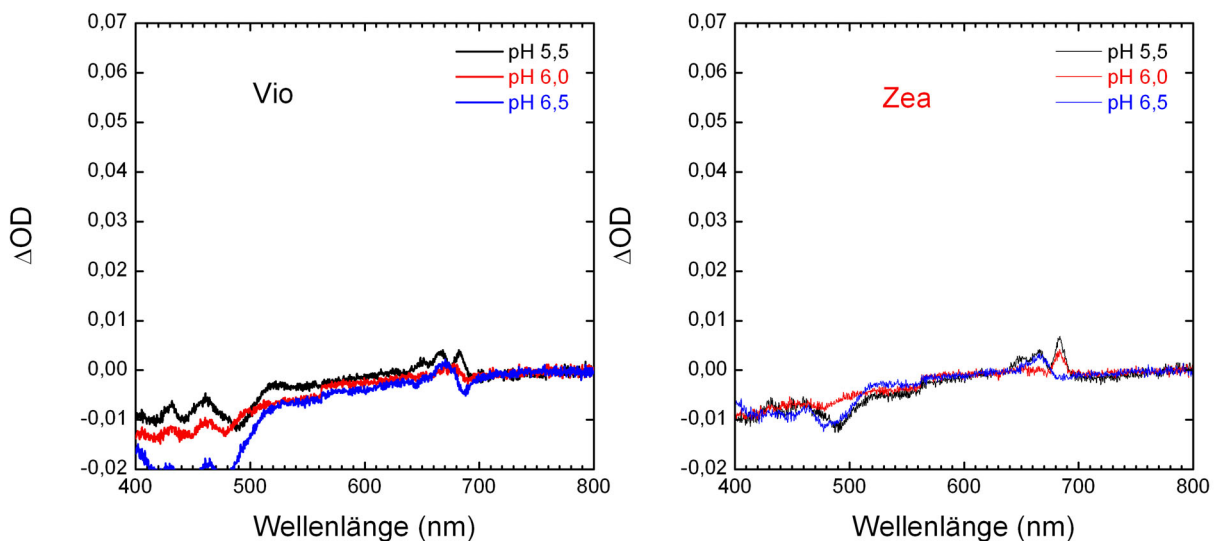


Abb. 52: Differenzspektren der Absorptionsmessungen an CP26 bei verschiedenen pH-Werten. **links:** mit Vio angereicherte Proben. **rechts:** mit Zea angereicherte Proben. Abgesehen von durch das verwendete Absorptionsspektrometer hervorgerufenen Messungenauigkeiten unter 500 nm ergeben sich keine Veränderungen.

4.2.2 Diskussion

Die Ergebnisse der Messungen an den CP zeigen, dass sich diese Proteine in Bezug auf ihren Beitrag zum Schutz vor hohen Lichtintensitäten deutlich von LHCII unterscheiden. So ist $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}$ in den Proteinen im Ausgangszustand bei pH = 7,5 bei allen drei mit Zea angereicherten CP deutlich größer, als in den korrespondierenden mit Vio angereicherten Proben. Der Austausch der Carotinoide, wie er bei hohen Lichtintensitäten in Pflanzen auftritt, scheint also zu verstärkten Car S₁–Chl *a* Q_y-Wechselwirkungen zu führen.

Interessanterweise besitzen die Proben jedoch eine wesentlich geringere Dynamik als LHCII. Bei Veränderung des pH-Wertes steigt $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}$ von sowohl CP26 als auch CP29 nicht deutlich an. In den Differenzspektren der Absorptionsmessungen zeigt sich auch keine mit LHCII vergleichbare Rotverschiebung der Absorptionsspektren.

Diese Beobachtungen können durch unterschiedliche Theorien beschrieben werden. Eine Möglichkeit wäre, dass die CP tatsächlich eine Rolle im Rahmen der Schutzmechanismen vor hohen Lichtintensitäten spielen. Allerdings steigt $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}$ nicht bei niedrigerem pH-Wert an, wie er bei hohen Lichtintensitäten auftritt. Somit scheinen die CP *in vitro* nicht pH-Wert induzierten Veränderungen unterworfen zu sein. Obwohl die mit Zea angereicherten CP also eine höhere Grundkapazität zum *Quenching* besitzen, steigt $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}$ nicht auf einen so hohen Wert wie bei Zea-LHCII bei pH = 5,5 an.

Eine andere Möglichkeit wäre jedoch, dass die im Experiment gewählten Bedingungen der pH-Wert-Änderung nicht geeignet sind, ein stärkeres *Quenchen* der CP hervorzurufen. Eventuell reagieren die CP *in vivo* weniger auf Änderungen des pH-Wertes oder werden durch andere Mechanismen getriggert, wie beispielsweise durch das Protein PsbS. Eine weitere Rolle könnte die Tatsache spielen, dass die CP Monomere sind, während LHCII als Trimer vorliegt und in dieser Form eher zur Aggregation fähig ist. Es besteht daher durchaus die Möglichkeit, dass durch die Änderung des pH-Wertes bei den Messungen an LHCII Aggregationseffekte aufgetreten sind, die zum Anstieg von $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}$ geführt haben, während die CP nur *in vivo* dazu fähig sind oder erst durch zusätzliche Reagenzien *in vitro* zur Aggregation gebracht werden können.

Diese Resultate müssen zudem in Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Gruppen gebracht werden. So konnte in CP29, CP26 und CP24^[24, 35] eine Abhängigkeit von Zea bei der Ausbildung von Carotinoid-Radikal-Kationen beobachtet werden. Die Detektion erfolgte über transiente Absorptionsmessungen im Bereich der Carotinoid-Radikalkationen, denen eine hohe Bedeutung im Rahmen des NPQ-Prozesses zugeschrieben wird. In den Studien

wurde postuliert, dass sich in Anwesenheit von Zea ein Zea–Chl-Heterodimer bildet, das nach einer Ladungstrennung und Rekombination zu Zea-Radikal-Kationen führt. Allerdings konnte von der Arbeitsgruppe in LHCII beim Austausch der Xanthophyll-Zyklus-Carotinoide keine Ausbildung von Carotinoid-Radikalkationen festgestellt werden.^[23]

In Verbindung mit den hier präsentierten Resultaten ist es wahrscheinlich, dass auch Carotinoid-Radikal-Kationen eine enge Verbindung zu den NPQ-Prozessen besitzen. So scheinen in den CP Car S_1 –Chl-Wechselwirkungen und Carotinoid-Radikal-Kationen unter Austausch von Vio durch Zea aufzutreten. Somit ist eine Beteiligung der CP am NPQ-Prozess sehr wahrscheinlich, wobei ihnen durch die hier präsentierten Resultate eine kleinere Beteiligung als LHCII zugeschrieben werden muss. Die Abwesenheit von Carotinoid-Radikal-Kationen in mit Zea angereicherten LHCII-Proben kann wie bereits erläutert (s. Kapitel 4.1.2) durch die fehlenden *Quenching*-Bedingungen verursacht sein.

4.3 Messungen an Pflanzen *in vivo*

4.3.1 Ergebnisse

Die bei den LHCII-Proben gefundene Korrelation zwischen $\Phi_{Kopplung}^{Car\ S_1-Chl}$ und dem *Quenching*-Zustand legt den Schluss nahe, dass die Wechselwirkung zwischen Car S_1 und Chl a Q_y zum Schutz der Pflanzen bei hohen Lichtintensitäten beiträgt. Aus diesem Grund wurden bereits zuvor gemessene Daten^[112], die an intakten Pflanzen aufgenommen worden waren, neu ausgewertet und auf ähnliche Korrelationen untersucht (s. Abb. 53).

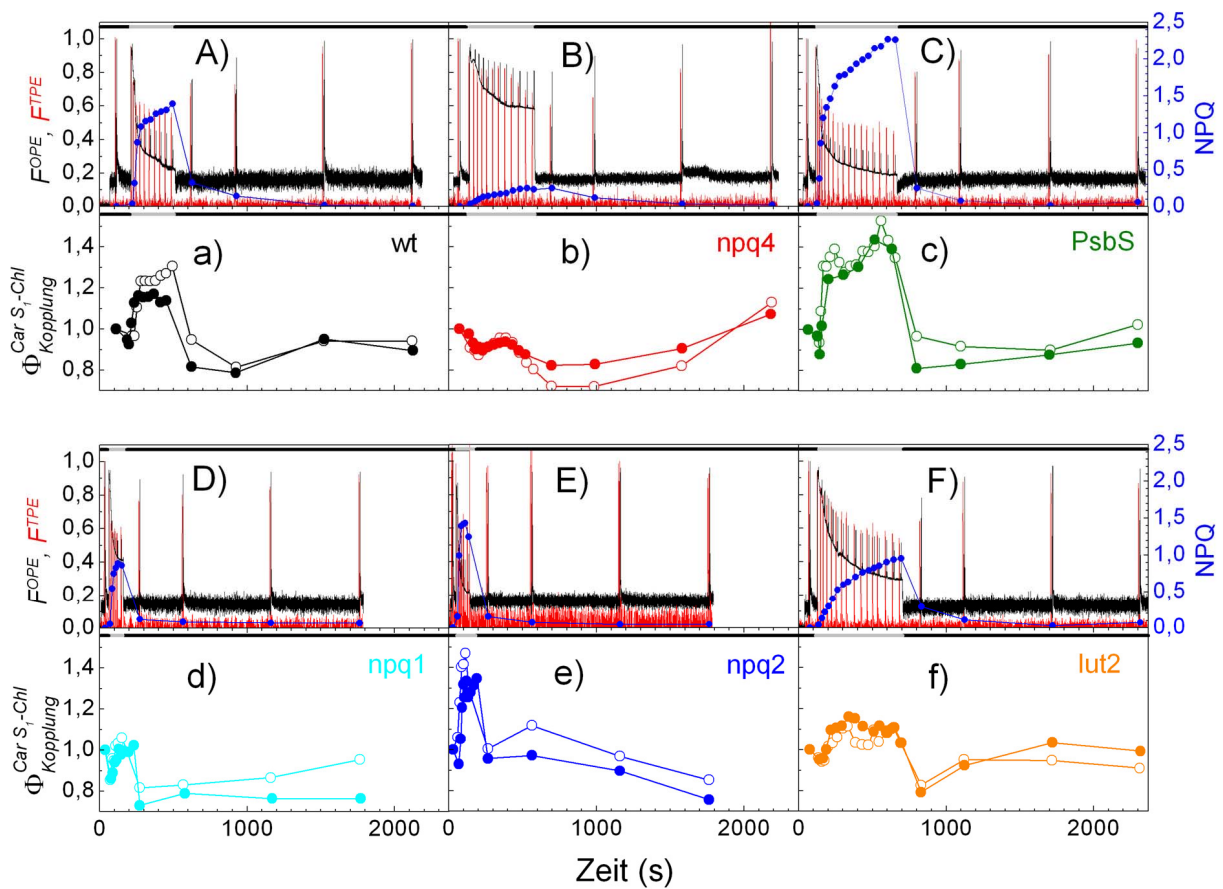


Abb. 53: A)-F): Typische Rohdaten für die Fluoreszenz nach OPE (F^{OPE}) und nach TPE (F^{TPE}) für verschiedene Varianten von *A. thaliana* während der Helladaption (graue Balken über den Graphen) und Dunkeladaption (schwarze Balken).^[112] In die Graphen wurden zusätzlich die mittels Gl. (20) errechneten NPQ-Werte eingefügt. Wie in Kapitel 3.3 erläutert, entsprechen sowohl OPE- als auch TPE-Pulse Saturierungsbedingungen. **a)-f):** Nach Gl. (21) errechnete Wechselwirkungsparameter $\Phi_{Kopplung}^{Car\ S_1-Chl}$ für die exemplarisch ausgesuchten Rohdaten (offene Kreise) und für die Mittelwerte aus mehreren (mindestens drei) voneinander unabhängigen Messungen (ausgefüllte Kreise).^[9]

Die Messungen erfolgten am Wildtyp und Mutanten von *A. thaliana* zunächst unter Helladaption und anschließender Dunkeladaption der Pflanzen. Dabei enthielten die Mutanten unterschiedliche Pigment- bzw. Proteinzusammensetzungen, um deren Beitrag zur Photoprotektion bestimmen zu können (s. Kapitel 3.6.3). Es wurde eine Standard-Messung mit dem PAM-Fluorimeter durchgeführt (s. Kapitel 3.2) und über den neu entwickelten Messaufbau kurz vor jedem sättigenden Lichtpuls des PAM ein zwei Sekunden langer Puls mit dem *Idler* aus dem Laseraufbau appliziert.

In Abb. 53 (A bis F) sind zur Veranschaulichung Rohdaten der Messung von F^{OPE} und F^{TPE} abgebildet. Die schwarzen Kurven sind die mit dem PAM aufgenommenen Standardergebnisse (vgl. dazu auch Abb. 33) und die roten Kurven stellen die Fluoreszenzen nach Zwei-Photonen-Anregung dar. Die Auswertung erfolgte unter Normalisierung des Signalrauschens der Instrumente auf null und die der maximalen Fluoreszenzausbeute F_M' auf eins. In A bis F ist in blau zusätzlich der nach Gl. (20) aus den Ein-Photonen-Daten berechnete *Quenching*-Parameter NPQ abgebildet. Aus F^{OPE} und F^{TPE} wurde der Parameter $\Phi_{Kopplung}^{Car S_I-Chl}$ nach Gl. (21) berechnet, und in Abb. 53 (in a bis f) in verschiedenen Farben mit offenen Kreisen dargestellt. Mit vollen Kreisen sind die Mittelwerte aus Messungen von mindestens drei unterschiedlichen Pflanzen, die an verschiedenen Tagen gemessen wurden, abgebildet. Die Pflanzen in A, B, C und F wurden unter Kurztagbedingungen und D und E unter Langtagbedingungen (s. Kapitel 3.6.3) aufgezogen. Der Wechsel der Wachstumsbedingungen hatte keinen Einfluss auf die Messergebnisse, wie mit zwei Wildtyp-Pflanzen, die jeweils unter einer der beiden Bedingungen aufgezogen wurden, gezeigt werden konnte.

Während der Helladaptation (aktinische Zeitperiode unter dem grauen Balken in A bis F) steigt $\Phi_{Kopplung}^{Car S_I-Chl}$ bei den Wildtyp-Pflanzen an und fällt nach dem Ende der aktinischen Phase wieder ab. Ein ähnliches Verhalten ist bei den Mutanten *WT+PsbS* und *npq2* zu sehen, die sich aufgrund ihres hohen PsbS- bzw. Zea-Gehaltes gut an die hohen Lichtintensitäten anpassen können. Bei ihnen steigt $\Phi_{Kopplung}^{Car S_I-Chl}$ sogar auf höhere Werte als beim Wildtyp. Die Mutanten *npq4* und *npq1* zeigen ein gegensätzliches Verhalten. Der Wechselwirkungsparameter $\Phi_{Kopplung}^{Car S_I-Chl}$ steigt nicht an oder fällt sogar ab. Die Mutanten sind aufgrund des Fehlens des Proteins PsbS bzw. des Carotinoids Zea wesentlich schlechter als der Wildtyp an veränderte Lichtverhältnisse angepasst. Der *lut2*-Mutant weist etwas niedrigere $\Phi_{Kopplung}^{Car S_I-Chl}$ -Werte als der Wildtyp auf, ist aber insgesamt mit diesem vergleichbar.

Bei Betrachtung der Veränderung des *Quenching*-Parameters NPQ (s. Abb. 53 A bis F in blau) zeigt sich, dass dieser ein ähnliches Verhalten wie die Veränderung von $\Phi_{Kopplung}^{Car S_I-Chl}$

aufweist. Es scheint, dass tatsächlich ebenfalls bei Pflanzen *in vivo* eine direkte Korrelation sowohl im hell- als auch dunkeladaptierten Zustand zwischen NPQ und $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_1\text{-Chl}}$ vorliegt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgte eine Auftragung der beiden Parameter aller Pflanzen gegeneinander (s. Abb. 54). Die Farbkodierung ist dabei die Gleiche wie in Abb. 53. Die Pflanzen, welche sich gut an hohe Lichtintensitäten anpassen können (*WT+PsbS* und *npq2*), zeigen eine wesentlich größere Dynamik als die Mutanten, denen wichtige Bestandteile fehlen (*npq1* und *npq4*). Bei Betrachtung aller Punkte ergibt sich eine klare lineare Korrelation zwischen den beiden Parametern ($\rho = 0,89$).

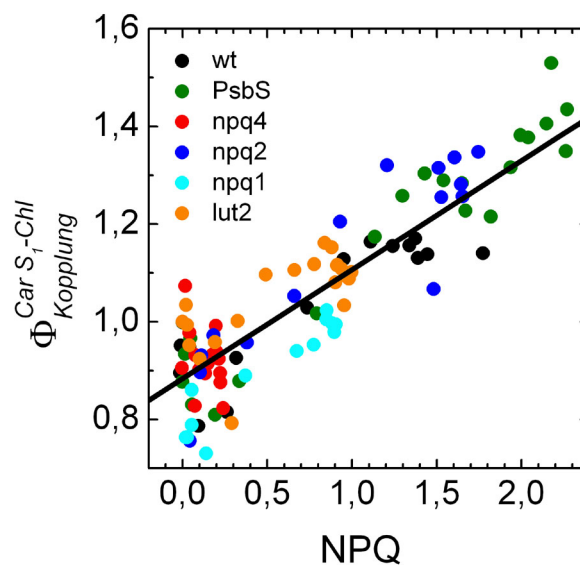


Abb. 54: Zusammenspiel zwischen dem Wechselwirkungsparameter $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_1\text{-Chl}}$ und dem zum jeweiligen Zeitpunkt herrschenden Regulationsstatus NPQ während Hell- und Dunkeladaption der Pflanzen aus Abb. 53. Es ist eine eindeutige Korrelation erkennbar. Die Auftragung erfolgte durch den Vergleich der $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_1\text{-Chl}}$ -Werte (Abb. 53 a bis f) und der zugehörigen NPQ-Werte (Abb. 53 A bis F, blau). Die Farben zur Kennzeichnung der Varianten von *A. thaliana* entsprechen Abb. 53: Wildtyp (schwarz), *WT+PsbS* (dunkelgrün), *npq4* (rot), *npq2* (dunkelblau), *npq1* (hellblau) und *lut2* (orange).^[9]

4.3.2 Diskussion

Das gleichzeitige Auftreten von gestiegenen Car S_1 -Chl-Wechselwirkungen in intakten Pflanzen, die immer mit NPQ linear korreliert sind, liefert deutliche Hinweise, dass auch in Pflanzen exzitonische Wechselwirkungen mit der Anpassung an hohe Lichtintensitäten einhergehen.

Da sowohl NPQ als auch $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car } S_1\text{-Chl}}$ in allen Mutanten, in denen ein bestimmtes Carotinoid wie Zea, Vio oder ein Lutein fehlt, nicht bis auf null abfallen, kann geschlussfolgert werden,

dass das Fehlen dieser Pigmente durch die anderen Carotinoide zumindest in Teilen ausgeglichen werden kann. Dadurch können trotz des Fehlens bestimmter Carotinoide Car S₁-Chl *a* Q_y-Wechselwirkungen hervorgerufen und somit die Pflanze geschützt werden. Da der kein PsbS ausbildende *npq4*-Mutant als einziger keinen Anstieg des Wechselwirkungsparameters während der aktinischen Phase zeigt, kann weiterhin geschlussfolgert werden, dass PsbS zur Ausbildung dieser Wechselwirkungen *in planta* essentiell ist.

Diese Resultate müssen in Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Gruppen gebracht werden. Bei der hier postulierten Ausbildung von exzitonischen Wechselwirkungen kommt es zur Bildung zweier neuer elektronischer Zustände. Diese vereinen die Eigenschaften der Ausgangszustände in sich. So liegt der eine energetisch höher als die Ausgangszustände und der andere niedriger. Durch den niedrig liegenden Energiezustand wird ein effektives Abfangen der Energie möglich.^[90] Des weiteren ist eine Mischung der Lebenszeiten der Ausgangsniveaus zu erwarten. Durch den Beitrag der kurzen Lebenszeiten des Car S₁-Niveaus (~10-30 ps) hätten die exzitonischen Zustände wesentlich kürzere Lebensdauern als die der Chlorophylle (~1800 ps) und könnten daher die überschüssige Energie auf einer kurzen Zeitskala abführen. Gilmore *et al.* konnten solche kürzeren Lebenszeiten (~400 ps) der angeregten Chl-Zustände in der Fluoreszenz von Pflanzen unter *Quenching*-Bedingungen beobachten.^[59] Darüber hinaus wurden von Ruban *et al.* vor kurzem Fluoreszenzspektren der kurzlebigen Fluoreszenz-Komponente in intakten Chloroplasten unter *Quenching*-Bedingungen gewonnen, die mit rotverschobenen Absorptionsspektren einhergehen. Diese Ergebnisse stehen sehr gut mit den in dieser Arbeit postulierten exzitonischen Wechselwirkungen im Einklang, da diese die Lebenszeitänderungen und Rotverschiebungen erklären würden.

Ein weiterer Zusammenhang besteht auch zu den Ergebnissen von Ma *et al.*, die in Thylakoiden unter *Quenching*-Bedingungen das Auftreten von sofortiger transienter Absorption im Spektralbereich des Car S₁-Niveaus identifizieren konnten, nachdem das niedrigste Chlorophyll-Niveau Chl Q_y angeregt wurde.^[91] Auch diese Beobachtungen lassen sich durch die Ausbildung von exzitonischen Wechselwirkungen unter *Quenching*-Bedingungen erklären. Diese würden zu einer sofortigen Bevölkering des Car S₁-Zustandes nach Chlorophyll-Anregung führen und somit die beobachtete verstärkte transiente Absorption verursachen.

Zusammen mit den hier präsentierten Ergebnissen liefern alle diese Beobachtungen klare Hinweise auf das Vorhandensein von tiefliegenden, kurzlebigen Car S₁-Chl *a* Q_y-Zuständen als die Hauptursache für die Abführung von Überschussenergie im Rahmen der Schutzprozesse der Pflanzen.

Natürlich sollten auch andere Erklärungsmöglichkeiten betrachtet werden, die ebenfalls zur Beschreibung der Ergebnisse möglich wären. Beispielsweise kann nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, dass die beobachtete gestiegene Car S₁–Chl-Wechselwirkung nicht ursächlich für den *Quenching*-Prozess, sondern eher nur eine Begleiterscheinung ist, welche durch pH-Wert induzierte Konformationsänderungen in den Antennenkomplexen von PSII auftritt.

Weiterhin könnten die vorgestellten Ergebnisse und das Modell zur Erklärung auch mit anderen Theorien kombiniert werden, wie z. B. der Ausbildung von Radikal-Kationen oder von Lutein 1 als *Quencher*. Es ist beispielsweise vorstellbar, dass die beobachteten exzitonischen Zustände Vorprodukte von Radikal-Kationen sind. Es wäre zudem möglich, dass Lutein an der Bildung von exzitonischen Zuständen beteiligt ist und dass Zea eher zur Regulierung der Ausbildung des *Quenching*-Zentrums beiträgt und unter Abwesenheit von Lutein auch direkt die Car S₁–Chl-Wechselwirkungen hervorrufen kann.

Es muss ebenfalls bedacht werden, dass über den in der Arbeit ermittelten Kopplungsparameter $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car S}_1\text{--Chl}}$ nur das Mittel der Wechselwirkungen aller in den Proben vorkommenden Carotinoiden abgebildet wird. Daher können die Ergebnisse in erster Linie ein Hinweis darauf sein, welche Rolle die einzelnen Carotinoide in der Photosynthese übernehmen. So zeigen beispielsweise sowohl der *lut2* (s. Abb. 53 f) als auch der *npq1*-Mutant (s. Abb. 53 d) einen niedrigeren NPQ- als auch niedrigere $\Phi_{\text{Kopplung}}^{\text{Car S}_1\text{--Chl}}$ -Werte als die Wildtyp-Pflanze (s. Abb. 53 a), was insbesondere die Bedeutung von Zea unterstreicht.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die im Rahmen der Doktorarbeit entwickelte Kombination aus konventionellem PAM-Fluorimeter und Zwei-Photonen-Aufbau ermöglicht genaue Einblicke in die Energietransferprozesse, die zur Regulation der Photosynthese führen. Dabei wird es möglich, vergleichende Messungen sowohl an intakten Pflanzen als auch an isolierten Pigment-Protein-Komplexen durchzuführen. Durch die Verwendung des PAM-Fluorimeters, welches sich als Standard in der Photosynthese-Forschung etabliert hat, ist zudem ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen möglich.

Mit diesem neu entwickelten Messaufbau konnten weitere Details der *Quenching*-Prozesse aufgeklärt werden. Es konnten erhöhte Car S₁-Chl *a* Q_y-Wechselwirkungen beobachtet werden, die sowohl in isolierten LHCII-Proteinen unter pH-Wert induzierten *Quenching*-Bedingungen, als auch in intakten Pflanzen während der Helladaptation auftreten. Dies ist ein starkes Indiz für die direkte Beteiligung von LHCII an den Schutzmechanismen der Pflanzen vor hohen Lichtintensitäten. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass ein intakter Xanthophyllzyklus für die Ausbildung der Wechselwirkungen eine Grundvoraussetzung ist. In den kleineren Lichtsammelkomplexen konnte keine derartige Dynamik festgestellt werden. Sie zeigen zwar größere Car S₁-Chl *a* Q_y-Wechselwirkungen nach Austausch von Vio durch Zea, welche jedoch nicht das Ausmaß wie in LHCII bei niedrigem pH-Wert erreichen. Daraus lässt sich schließen, dass diese Proteine eine kleinere Rolle an den Regulationsmechanismen einnehmen, als von manchen Arbeitsgruppen postuliert wird.^[34, 35]

Diese an isolierten Lichtsammelkomplexen erzielten Ergebnisse konnten ebenfalls mit Messungen an lebenden Pflanzen in Zusammenhang gebracht werden, was die Bedeutung des Parameters $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}$ unterstreicht. Die Messungen an intakten Pflanzen zeigten auch, dass dem Protein PsbS eine äußerst wichtige Rolle beim *Quenching*-Prozess zukommt. Ohne seine Anwesenheit konnte in lebenden Pflanzen kein Anstieg von $\Phi_{Kopplung}^{Car S_1-Chl}$ festgestellt werden. Somit scheint dem Protein gewissermaßen eine Katalysatorfunktion zur Ermöglichung des *Quenching*-Zustandes zuzukommen. Warum dahingegen in den Messungen an LHCII in Lösung und ohne das Einwirken von PsbS ebenfalls diese Wechselwirkungen beobachtet werden konnten, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei LHCII in Lösung schon kleine Veränderungen wie pH-Änderungen oder Aggregationseffekte zu den Wechselwirkungen führen. In intakten Thylakoidmembranen könnten hingegen Hinderungsmechanismen existieren, welche die Ausbildung von exzitonischen Wechselwirkungen ohne die Mitwirkung von PsbS verhindern.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein Modell zur Beschreibung der Schutzmechanismen der Pflanzen vor hohen Lichtintensitäten ableiten (s. Abb. 55). Unter Anwesenheit von Zeaxanthin und unter Mitwirkung von PsbS bilden sich stärkere Wechselwirkungen zwischen Car S₁ und Chl *a* Q_y aus, wodurch es zur Ausbildung von exzitonischen Zuständen kommt. Dabei entsteht ein tieferliegendes Energieniveau, welches als Energiesenke für Überschussenergie wirken kann. Dadurch wird überschüssige Energie abgeleitet und in Wärme umgewandelt.

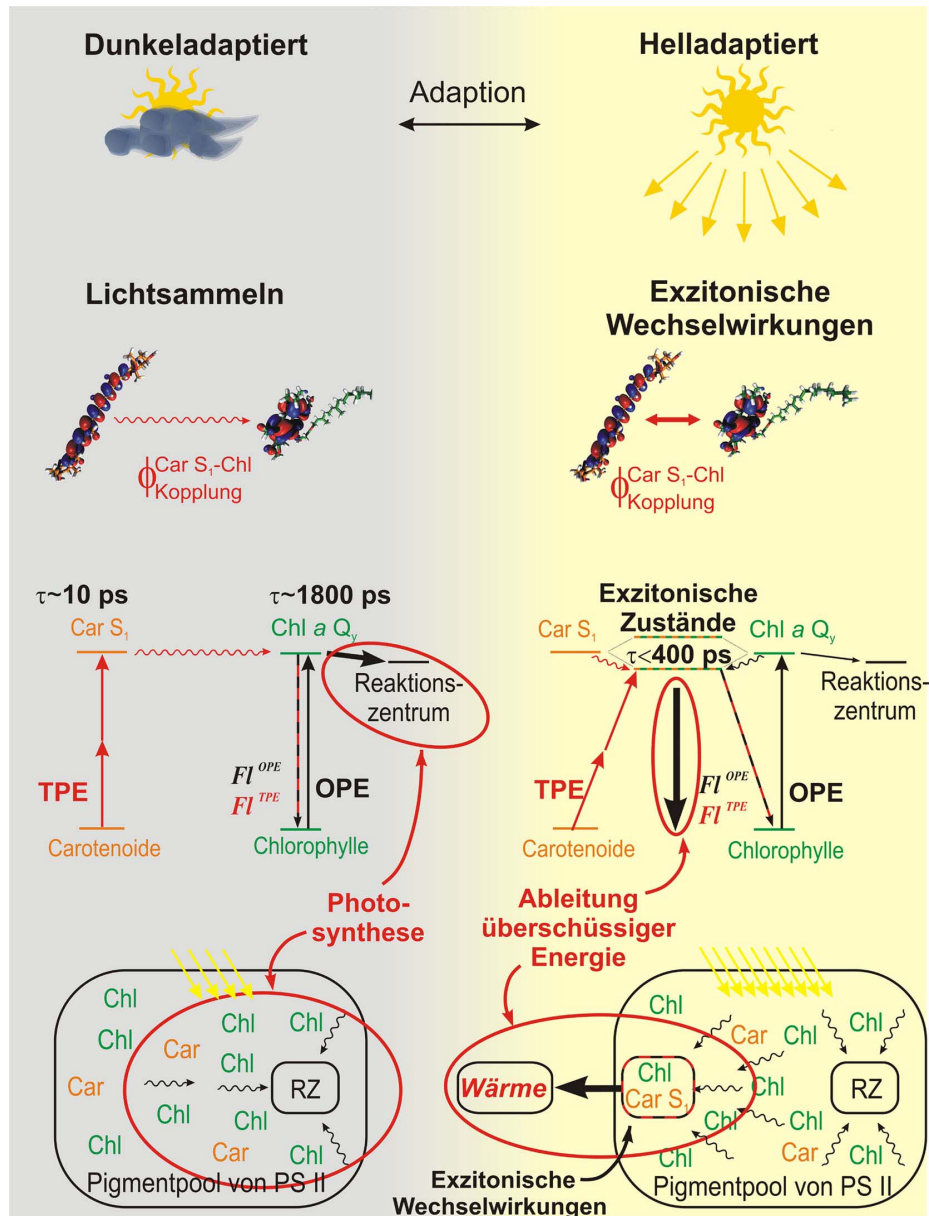


Abb. 55: Modell zur Erklärung der Prozesse, die zum NPQ führen.^[9] Durch gestiegene Wechselwirkungen zwischen Car und Chl bilden sich exzitonische Wechselwirkungen, wodurch sich Energiesenken im helladaptierten Zustand bilden, die zum *Quenchen* überschüssiger Energie und Umwandlung der Energie in Wärme führen. Die Darstellung der Moleküle erfolgte mit VMD^[113].

Das Auftreten von exzitonicen Zuständen unter *Quenching*-Bedingungen erklärt zudem die an Pflanzen und Thylakoiden erzielten Ergebnisse anderer Gruppen. So führen exzitonicen Zustände sowohl zur beobachteten kürzeren Fluoreszenzlebenszeit unter *Quenching*-Bedingungen als auch zum sofortigen Anstieg der transienten Absorption des Car S₁-Zustandes nach Anregung im Bereich der Chl Q_y-Bande .

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die dargestellten Ergebnisse klar zeigen, dass gestiegene Car S₁-Chl *a* Q_y-Wechselwirkungen immer mit *Quenching*-Zuständen in LHCII und in Pflanzen korrelieren. Diese Ergebnisse bilden einen wichtigen Schritt auf dem Weg zum vollständigen Verständnis der Prozesse, die in Pflanzen zum Schutz vor hohen Lichtintensitäten führen. Mit dem neuen Aufbau ist es möglich, diese Wechselwirkungen in Echtzeit in lebenden Pflanzen zu quantifizieren und mit Messungen an isolierten Systemen zu vergleichen.

Ein Problem bleibt jedoch die Beteiligung von Aggregationseffekten, die ebenfalls eine Rolle beim NPQ übernehmen könnten. Weitere Studien müssen zeigen, ob unter anderen Bedingungen als der Veränderung des pH-Wertes, auch in den kleineren Lichtsammelkomplexen ähnlich starke Car S₁-Chl *a* Q_y-Wechselwirkungen wie in LHCII induziert werden können. Dazu wäre es notwendig, die Proteine anderen Bedingungen *in vitro* auszusetzen und somit mögliche Konformationsänderungen, die *in vivo* auftreten könnten, herbeizuführen. Insbesondere die Trennung und der Vergleich von Messungen *in vivo* und *in vitro* wird jedoch auch weiterhin zu Schwierigkeiten in der Interpretation von Messergebnissen führen.

Durch den neuen Aufbau wird es möglich werden, die genaue Stelle, an der die Energie *gequencht* wird, zu identifizieren. Einblicke in diese Fragestellung können LHCII-Proteine liefern, bei denen bestimmte Chlorophylle durch genetische Manipulationen fehlen. Unter Wiederholung der in dieser Arbeit vorgestellten Messungen unter gleichen Bedingungen mit solchen Proben, müssten die hier gezeigten Effekte bei Fehlen des entsprechenden Chlorophylls ausbleiben.

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Promotion beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir in den vergangenen acht Jahren stets jedwede Unterstützung gewährt hat, die ich zum Studium benötigte. Darüber hinaus hat erst die Förderung meines wissenschaftlichen Interesses durch sie in meiner Kindheit und Jugend dazu geführt, dass ich mich zu einem naturwissenschaftlich interessierten Menschen entwickelt habe, der Interesse an der Beantwortung und experimentellen Untersuchung unbeantworteter Fragen hat.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Jomo Walla bedanken, der mir ermöglicht hat, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Durch moderne Untersuchungsmethoden und interessante Forschungsgebiete wurde so eine abwechslungsreiche Forschungstätigkeit geboten. Außerdem gilt ihm mein Dank für die Ermöglichung von weiterbildenden Maßnahmen während meiner Promotion.

Auch möchte ich mich bei meinen Kollegen an der TU Braunschweig und am MPI Göttingen bedanken. Axel Wehling, Anna Cypionka, Claudia Quentmeier, Larissa-Natalie Bieritz, Pen-Nan Liao, Nour Hafi, Wiebke Pohl, Birgit Gerke und Christoph Holleboom haben meine Promotion durch Diskussionen und Ratschläge erst ermöglicht. Aber auch den in unserer Arbeitsgruppe tätigen Studienarbeitern Michael Maczka und Ute Schmidt sei für ihre Unterstützung bei Messungen gedankt.

Weiterhin gilt mein Dank einigen weiteren Kollegen aus dem Institut für Physikalische und Theoretische Chemie. Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Gericke danke ich für die Organisation des Utah-Austauschprogramms, das eine unvergessliche Erfahrung in meinem Studium war, und für die Übernahme der Aufgabe des Zweitprüfers. Michael Gaus, Matthias Böttger, Tim Berner, Benjamin Woiczikowski, Tino Wolter, Inga Schack und Tomáš Kubař möchte ich für die Diskussionen und anderweitigen Unterstützungen während meiner Zeit an der TU Braunschweig danken.

Ein großer Dank gilt Christoph Hoge für die mehrfache und sehr gründliche Durchsicht der Dissertation und für wertvolle Änderungsanregungen. Insbesondere, da er diese Aufgabe bereits bei meiner Diplomarbeit übernommen hatte. Auch bei Jan Frähmcke und Felix Meincke möchte ich mich für Ihre Korrekturen bedanken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an meine Lebensgefährtin Silke Lubahn richten, die mir durch ihr geduldiges Zuhören bei Problemen und bei ihrer Lösungsfindung während meiner Promotion eine große Last von den Schultern genommen hat. Und auch für ihre Mitwirkung an der finalen Version der Dissertation sei ihr an dieser Stelle gedankt.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Demmig-Adams, B; Adams, WW; The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis *Trends Plant Sci.* **1996**, 1, 21-26.
- (2) Horton, P; Ruban, AV; Walters, RG; Regulation of Light Harvesting in Green Plants *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1996**, 47, 655-684.
- (3) Müller, P; Li, X-P; Niyogi, KK; Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy *Plant Physiology* **2001**, 125, 1558–1566.
- (4) Niyogi, KK; Li, X-P; Rosenberg, V; Jung, H-S; Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* **2004**, 56, 375 - 382.
- (5) Holt, NE; Zigmantas, D; Valkunas, L; Li, X-P; Niyogi, KK; Fleming, GR; Carotenoid Cation Formation and the Regulation of Photosynthetic Light Harvesting *Science* **2005**, 307, 433-436.
- (6) Demmig-Adams, B; Adams, WW; Photoprotection and other responses of plants to high light stress *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1992**, 43, 599-626.
- (7) Havaux, M; Dall'Osto, L; Cuine, S; Giuliano, G; Bassi, R; The Effect of Zeaxanthin as the Only Xanthophyll on the Structure and Function of the Photosynthetic Apparatus in *Arabidopsis thaliana* *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, 13878–13888.
- (8) Frank, HA; Cua, A; Chynwat, V; Young, A; Gosztola, D; Wasielewski, MR; Photo-physics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis *Photosynth. Res.* **1994**, 41, 389-395.
- (9) Bode, S; Quentmeier, C; Liao, P-N; Barros, T; Wilk, L; Bittner, F; Walla, PJ; On the formation of excitonic carotenoid dark state - chlorophyll states regulating plant photosynthesis *PNAS* **2009**, submitted.
- (10) Tavan, P; Schulten, K; Electronic excitation in finite and infinite polyenes *Phys. Rev. B* **1987**, 36, 4337-4358.
- (11) Shreve, AP; Trautman, JK; Owens, TG; Albrecht, AC; Two-photon excitation spectroscopy of thylakoid membranes from *Phaeodactylum tricornutum*: Evidence for an in vivo two-photon-allowed carotenoid state *Chemical Physics Letters* **1990**, 170, 51-56.
- (12) Berg, JM; Tymoczko, JL; Stryer, L; **2007** *Biochemie* (W.H. Freeman and Company, New York).
- (13) Blankenship, RE; **2002** *Molecular Mechanisms of Photosynthesis* (Blackwell Science, Oxford).
- (14) Voet, D; Voet, JG; Pratt, CW; **2002** *Lehrbuch der Biochemie* (Wiley-VCH, Weinheim).
- (15) Raven, PH; Ebvert, RF; Eichhorn, SE; **2006** *Biologie der Pflanzen* (de Gruyter, New York).
- (16) Trench, RK; Of 'leaves that crawl': functional chloroplasts in animal cells *Symp Soc Exp Biol.* **1975**, 29, 229-265.
- (17) Rumpho, ME; Worful, JM; Lee, J; Kannan, K; Tyler, MS; Bhattacharya, D; Moustafa, A; Manhart, JR; Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene psbO to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica* *PNAS* **2008**, 105, 17867-17871.
- (18) Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, JD; **2004** *Molekularbiologie der Zelle* (Garland Publishing, New York, NY).
- (19) Liu, Z; Wang, K; Kuang, T; Zhang, J; Gui, L; An, X; Chang, W; Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution *Nature* **2004**, 428, 287-292.

- (20) Loll, B; Kern, J; Saenger, W; Zouni, A; Biesiadka, J; Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II *Nature* **2005**, 438, 1040 - 1044.
- (21) Dekker, JP; Boekema, EJ; Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants *Biochimica et Biophysica Acta* **2005**, 12 - 39.
- (22) Standfuss, J; van, ACT; Scheltinga; Lamborghini, M; Kühlbrandt, W; Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light harvesting complex at 2.5Å resolution *The EMBO Journal* **2005**, 24, 919–928.
- (23) Avenson, TJ; Ahn, TK; Zigmantas, D; Niyogi, KK; Li, Z; Ballottari, M; Bassi, R; Fleming, GR; Zeaxanthin Radical Cation Formation in Minor Light-harvesting Complexes of Higher Plant Antenna *The Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283, 3550 - 3558.
- (24) Cheng, Y-C; Ahn, TK; Avenson, TJ; Zigmantas, D; Niyogi, KK; Ballottari, M; Bassi, R; Fleming, GR; Kinetic modeling of charge-transfer quenching in the CP29 minor complex *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 13418-13423.
- (25) Pascal, AA, et al.; Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting *Nature* **2005**, 436, 134-137.
- (26) Papageorgiou, GC, Govindjee; **2004** *Advances in Photosynthesis and Respiration: Chlorophyll a Fluoreszenz* (Springer, Dordrecht).
- (27) Pascal, AA, et al.; Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting *Nature* **2005**, 436, 134-137.
- (28) Ruban, AV; Berera, R; Iliaia, C; van Stokkum, IHM; Kennis, JTM; Pascal, AA; van Amerongen, H; Horton, P; van Grondelle, R; Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants *Nature* **2007**, 450, 575 - 579.
- (29) Nield, J; Funk, C; Barber, J; Supermolecular structure of photosystem II and location of the PsbS protein *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **2000**, 355, 1337 - 1344.
- (30) Nield, J; Orlova, EV; Morris, EP; Gowen, B; van Heel, M; Barber, J; 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis *Nature Structural Biology* **2000**, 7, 44 - 47.
- (31) Yakushevskaya, AE; Keegstra, W; Boekema, EJ; Dekker, JP; Andersson, J; Jansson, S; Ruban, AV; Horton, P; The structure of photosystem II of Arabidopsis: localization of the CP26 and CP29 antenna complexes *Biochemistry* **2003**, 42, 608-613.
- (32) Bassi, R; Croce, R; Cugini, D; Sandona, D; Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides information of chromophores bound into multiple sites *PNAS* **1999**, 10056-10061.
- (33) Sandona, D; Croce, R; Pagano, A; Crimi, M; Bassi, R; Higher plants light harvesting proteins. Structure and function as revealed by mutation analysis of either protein or chromophore moieties *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1365, 207-214.
- (34) Avenson, TJ; Ahn, TK; Niyogi, KK; Ballottari, M; Fleming, GR; Lutein can act as a switchable charge transfer charge transfer quencher in the CP26 light-harvesting complex *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 2830-2835.
- (35) Ahn, TK; Avenson, TJ; Ballottari, M; Cheng, Y-C; Niyogi, KK; Bassi, R; Fleming, GR; Architecture of a Charge-Transfer State Regulating Light Harvesting in a Plant Antenna Protein *Science* **2008**, 320, 794 - 797.
- (36) Berthold, DA; Babcock, GT; Yokum, CF; A highly resolved, oxygen evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes *FEBS Letters* **1981**, 134, 231-234.
- (37) Hankamer, B; Nield, J; Zheleva, D; Boekema, EJ; Jansson, S; Barber, J; Three-Dimensional Structure of the Photosystem II Core Dimer of Higher Plants Determined by Electron Microscopy *J. Struct. Biol.* **2001**, 135, 262 - 269.

- (38) Kim, S; Sandusky, P; Bowlby, NR; Aebersold, R; Green, BR; Vlahakis, S; Yocum, CF; Pichersky, E; Characterization of a spinach *psbS* cDNA encoding the 22 kDa protein of photosystem II *FEBS Lett.* **1992**, 314, 67-71.
- (39) Wedel, N; Klein, R; Ljungberg, U; Andersson, B; Herrmann, RG; The single-copy gene *psbS* codes for a phylogenetically intriguing 22 kDa polypeptide of photosystem II *FEBS Lett.* **1992**, 314, 61-66.
- (40) Kim, S; Pichersky, E; Yocum, CR; Topological studies of spinach 22 kDa protein of PSII *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1188, 339-348.
- (41) Funk, C; Adamska, I; Green, BR; Andersson, B; Renger, G; The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 30141-30147.
- (42) Funk, C; Schroder, WP; Napiwotzki, A; Tjus, SE; Renger, G; Andersson, B; The PSII-S protein of higher plants - a new type of pigment-binding protein *Biochemistry* **1995**, 34, 11133-11141.
- (43) Dominici, P; Caffari, S; Armenante, F; Ceoldo, S; Crimi, M; Bassi, R; Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 22750 - 22758.
- (44) Aspinall-O'Dea, M; Wentworth, M; Pascal, A; Robert, B; Ruban, A; Horton, P; In vitro reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants *PNAS* **2002**, 99, 16331 - 16335.
- (45) Li, XP; Björkman, O; Shih, C; Grossman, AR; Rosenquist, M; Jansson, S; Niyogi, KK; A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **2000**, 403, 391-395.
- (46) Horton, P; Ruban, AV; Wentworth, M; Allosteric regulation of the light-harvesting system of photosystem II *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **2000**, 355, 1361 - 1370.
- (47) Jordan, P; Fromme, P; Witt, HT; Klukas, O; Saenger, W; Krauss, N; Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 angstrom resolution *Nature* **2001**, 411, 909-917.
- (48) Bode, S; Zwei-Photonen-Untersuchungen von photosynthetisch relevanten Carotinoiden; TU Braunschweig, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie; **2006**
- (49) Plant Metabolic Network (PMN), Arabidopsis thaliana col Pathway: superpathway of carotenoid biosynthesis, <http://www.plantcyc.org:1555/ARA/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=CAROTENOID-PWY>, 20. März, **2009**.
- (50) Polívka, T; Sundström, V; Ultrafast dynamics of carotenoid excited states - From solution to natural and artificial systems *Chem. Rev.* **2004**, 104, 2021-2071.
- (51) Walla, PJ; Linden, PA; Hsu, CP; Scholes, GD; Fleming, GR; Femtosecond dynamics of the forbidden carotenoid S-1 state in light-harvesting complexes of purple bacteria observed after two-photon excitation *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, 97, 10808-10813.
- (52) Walla, PJ; Yom, J; Krueger, BP; Fleming, GR; Two-photon excitation spectrum of light-harvesting complex II and fluorescence upconversion after one- and two-photon excitation of the carotenoids *Journal of Physical Chemistry B* **2000**, 104, 4799-4806.
- (53) Wehling, A; Walla, PJ; A Two-Photon Excitation Study on the Role of Carotenoid Dark States in the Regulation of Plant Photosynthesis *Photosynthesis Research* **2006**, 90, 101-110.
- (54) Hilbert, M; Wehling, A; Schlodder, E; Walla, PJ; Two-Photon-Sensitized Fluorescence and Excitation Spectra of Photosystem I of *Thermosynechococcus elongatus* *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 13022-13030.
- (55) Bode, S; Quentmeier, CC; Liao, P-N; Barros, T; Walla, PJ; Xanthophyll-cycle dependent changes in the energy transfer between carotenoid dark states and chlorophylls in LHC II and living plants *Chemical Physics Letters* **2007**, 450, 379-385.

- (56) Horton, P; Wentworth, M; Ruban, A; Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching *FEBS Letters* **2005**, 579, 4201 - 4206.
- (57) Demmig-Adams, B; Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1020, 1-24.
- (58) Gilmore, AM; Yamamoto, HY; Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin independent quenching *Photosynthesis Research* **1993**, 35, 67-78.
- (59) Gilmore, AM; Hazlett, TL; Govindjee; Xanthophyll cycle dependent quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence: Formation of a quenching complex with a short fluorescence lifetime *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92, 2273-2277.
- (60) Jahns, P; Mische, B; Kinetic correlation of recovery from photoinhibition and zeaxanthin epoxidation *Planta* **1996**, 198, 202 - 210.
- (61) Krause, GH; Weis, E; Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology: II. Interpretation of fluorescence signals *Photosynth. Res.* **1984**, 5, 139 - 157.
- (62) Schreiber, U; Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology. The measuring system. *Photosynth. Res.* **1983**, 4, 361-373.
- (63) Krause, GH; Weis, E; Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **1991**, 42, 313 - 349.
- (64) Krause, GH; Vernotte, C; Briantais, J-M; Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. Resolution into two components. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 679, 116-124.
- (65) Eskling, M; Arvidsson, P-O; Åkerlund, H-E; The xanthophyll cycle, its regulation and components *Physiol. Plant.* **1997**, 100, 806-816.
- (66) Gilmore, AM; Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves *Physiol. Plant.* **1997**, 99, 197-209.
- (67) Bassi, R; Caffari, S; Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls *Photosynth. Res.* **2000**, 64, 243 - 256.
- (68) Bonente, G; Howes, BD; Caffari, S; Smulevich, G; Bassi, R; Interactions between the PSII subunit PsbS and xanthophylls studied in vivo and in vitro *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283, 8434-8445.
- (69) Krause, GH; Jahns, P **2004** in *Chlorophyll a Fluorescence*, ed. Papageorgiou, G. C., Govindjee (Springer, The Netherlands), Vol. 19, pp. 463 - 495.
- (70) Aro, EM; Virgin, I; Andersson, B; Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover *Biochimica et Biophysica Acta* **1993**, 1143, 113 - 134.
- (71) Turro, NJ; **1991** *Modern Molecular Photochemistry* (University Science Books, Menlo Park, CA).
- (72) Förster, T; Intermolecular energy migration and fluorescence *Ann. Phys.* **1948**, 2, 55-75.
- (73) Förster, T; Transfer mechanisms of electronic excitation *Disc. Faraday Soc.* **1959**, 27, 7-17.
- (74) van Grondelle, R; Excitation energy transfer, trapping and annihilation in photosynthetic systems *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 811, 147-195.
- (75) Lakowitz, JR; **2006** *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer, Baltimore).
- (76) Walla, PJ; **2009** *Modern Biophysical Chemistry* (Wiley-VCH, Weinheim).
- (77) Dexter, DL; A theory of sensitized luminescence in solids *Journal of Chemical Physics* **1953**, 21, 834-850.
- (78) Häder, D-P; **1999** *Photosynthese* (Thieme).
- (79) van Amerongen, H; Valkunas, L; van Grondelle, R; **2000** *Photosynthetic Excitons* (World Scientific, New York).
- (80) Coherent, I; **2004** *Vitesse Duo Laser Operator's Manual*.

- (81) Jesse, K; **2005** *Femtosekundenlaser* (Springer, Berlin).
- (82) Coherent, I; **1997** *RegA Model 9000 Laser Operator's Manual*.
- (83) Coherent, I; **1994** *Optical Parametric Amplifier Operator's Manual*.
- (84) Schreiber, U; Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer *Photosynthesis Research* **1986**, 9, 261-272.
- (85) Lichtenthaler, HK; Buschmann, C; Knapp, M; How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{fd} of leaves with the PAM fluorometer *Photosynthetica* **2005**, 43, 379-393.
- (86) Schreiber, U; Chlorophyll Fluorescence yield changes as a tool in plant physiology: I. The measuring system *Photosynth. Res.* **1983**, 4, 361 - 373.
- (87) Walla, PJ; Linden, PA; Ohta, K; Fleming, GR; Excited-state kinetics of the carotenoid S-1 state in LHC II and two-photon excitation spectra of lutein and beta-carotene in solution: Efficient car S-1 \rightarrow Chl electronic energy transfer via hot S-1 states? *Journal of Physical Chemistry A* **2002**, 106, 1909-1916.
- (88) Wehling, A; Walla, PJ; Timeresolved Two-Photon Spectroscopy of PS I determines hidden Energy Path Ways *J. Phys Chem. B* **2005**, 109, 24510-24516.
- (89) Bode, S; Quentmeier, CC; Liao, P-N; Barros, T; Walla, PJ; Xanthophyll-cycle dependent changes in the energy transfer between carotenoid dark states and chlorophylls in LHC II and living plants *Chemical Physics Letters* **2008**, 450, 379-385.
- (90) van Amerongen, H; van Grondelle, R; Understanding the energy transfer function of LHCII, the major light harvesting complex of green plants *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 1005, 604-617.
- (91) Ma, YZ; Holt, NE; Li, XP; Niyogi, KK; Fleming, GR; Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, 4377-4382.
- (92) Hsu, C-P; Walla, PJ; Head-Gordon, M; Fleming, GR; The Role of the S1 State of carotenoids in Photosynthetic Energy Transfer: The Light Harvesting Complex II of Purple Bacteria *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105, 11016-11025.
- (93) Burke, JJ; Ditto, CL; Arntzen, CJ; Involvement of the light-harvesting complex in cation regulation of excitation energy distribution in chloroplasts *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1978**, 187, 252-263.
- (94) Kühlbrandt, W; Thaler, T; Wehrli, E; The structure of membrane crystals of the light harvesting chlorophyll a/b protein complex *J. Cell. Biol.* **1983**, 96, 1414-1424.
- (95) Mullet, JE; Arntzen, CJ; Simulation of grana stacking in a model membrane system. Mediation by a purified light-harvesting pigment-protein complex from chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **1980**, 589, 100-117.
- (96) Rogl, H; Kosemund, K; Collinson, I; Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography *FEBS Lett.* **1998**, 432, 21-26.
- (97) Standfuss, J; Kühlbrandt, W; The three isoforms of the light-harvesting complex II: Spectroscopic features, trimer formation and functional roles *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 36884-36891.
- (98) Plumley, FG; Schmidt, GW; Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, 84, 146-150.
- (99) Paulsen, H; Finkenzeller, B; Kühlein, N; Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein *European Journal of Biochemistry* **1993**, 215, 809-816.
- (100) Gilmore, AM; Yamamoto, HY; Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-endcapped, lightly carbon-loaded C18 high-performance liquid chromatographic column *Journal of Chromatography* **1991**, 543, 137-145.

- (101) Pigliucci, M **2002** in *The Arabidopsis Book*, eds. Somerville, C. R. and Meyerowitz, E. M. (American Society of Plant Biologists, Rockville).
- (102) Niyogi, KK; Grossman, AR; Björkman, O; Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion *Plant Cell* **1998**, 10, 1121-1134.
- (103) Pogson, B; McDonald, KA; Truong, M; Britton, G; DellaPenna, D; Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants *Plant Cell* **1996**, 8, 1627-1639.
- (104) Li, X-P; Müller-Moulé, P; Gilmore, AM; Niyogi, KK; PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition *PNAS* **2002**, 99, 15222 - 15227.
- (105) Göppert-Mayer, M; Elementary processes with two-quantum transitions *Ann. d. Physik* **1931**, 9, 273-295.
- (106) Ruban, AV; Young, AJ; Horton, P; Modulation of chlorophyll fluorescence quenching in isolated light harvesting complex of Photosystem II *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1186, 123-127.
- (107) Wentworth, M; Ruban, AV; Horton, P; The Functional Significance of the Monomeric and Trimeric States of the Photosystem II Light Harvesting Complexes *Biochemistry* **2004**, 43, 501-509.
- (108) Amarie, S; Standfuss, J; Barros, T; Kühlbrandt, W; Dreuw, A; Wachtveitl, J; Carotenoid radical cations as a probe for the molecular mechanism of nonphotochemical quenching *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 3481-3487.
- (109) Lampoura, SS; Barzda, V; Owen, GM; Hoff, AJ; van Amerongen, H; Aggregation of LHCII leads to a Redistribution of the Triplet over the Central Xanthophylls in LHCII *Biochemistry* **2002**, 41, 9139-9144.
- (110) Garab, G, et al.; Light-Induced Trimer to Monomer Transition in the Main Light-Harvesting Antenna Complex of Plants: Thermo-Optic Mechanism *Biochemistry* **2002**, 41, 15121-15129.
- (111) Wentworth, M; Ruban, AV; Horton, P; Chlorophyll fluorescence quenching in isolated light harvesting complexes induced by zeaxanthin *FEBS Lett.* **2000**, 471, 71-74.
- (112) Quentmeier, C; Zweiphotonen-Spektroskopie an Wildtyp-Pflanzen und Mutanten von *Arabidopsis thaliana*; TU Braunschweig; **2008**
- (113) Humphrey, W; Dalke, A; Schulten, K; VMD - Visual Molecular Dynamics *J. Molec. Graphics* **1996**, 14, 33-38.

8 Anhang

RE: Reprint request

Donnerstag, 21. Mai, 2009 18:53 Uhr

Von: "PNAS Permissions" <PNASPermissions@nas.edu>

An: "Stefan Bode" <s.bode@tu-bs.de>

Dear Dr. Bode,

Permission is granted for your use of the figure as described in your message below. Please cite the full journal references and "Copyright (copyright year) National Academy of Sciences, U.S.A."

Best regards,
Siyuan Xie for
Diane Sullenberger
Executive Editor
PNAS

-----Original Message-----

From: Stefan Bode [mailto:s.bode@tu-bs.de]

Sent: Tuesday, May 19, 2009 7:49 AM

To: PNAS Permissions

Subject: Reprint request

Dear ladies and gentlemen,

i want to reuse content from a paper from PNAS for my thesis:

1. full name, affiliation, and title

My name is Stefan Bode. I am working at the TU Braunschweig, Institute for Physical and Theoretical Chemistry.

2. Your complete mailing address, phone number, fax number, and e-mail address

TU Braunschweig, Institute for Physical and Theoretical Chemistry,

Hans Sommer Str. 10, 38106 Braunschweig, Germany

Phone: +49 531 391-5328

Fax: +49 531 391-5352

Mail: s.bode@tu-bs.de

3. PNAS volume number, issue number, and issue date

PNAS, Volume 96, approved June, 28 1999

4. PNAS article title

Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound into multiple sites

5. PNAS authors' names

Roberto Bassi*, Roberta Croce, Daniela Cugini, Dorianna Sardonà

6. Page numbers of items to be reprinted

figure on page 10058

7. Figure/table number or portion of text to be reprinted

Figure 2

The title of my thesis will be "Exzitonsche Wechselwirkungen als Beitrag zur Photoprotektion in Pflanzen", the author is Stefan Bode. I will publish the thesis by the Universitätsbibliothek Braunschweig. The publication will be for non-commercial use. I will make approximately 15 copies.

Please let me know if the permission is free of charge. Otherwise i won't reprint the figures.

Best wishes

Stefan Bode

--

Stefan Bode

TU Braunschweig

Institut für Physikalische und Theoretische Chemie

**OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 19, 2009

This is a License Agreement between Stefan Bode ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Oxford University Press, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2192460375288
License date	May 19, 2009
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Journal of Experimental Botany
Licensed content title	Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis?
Licensed content author	Krishna K. Niyogi, et. al.
Licensed content date	January 26, 2005
Type of Use	Thesis / Dissertation
Institution name	TU Braunschweig
Title of your work	Exzitatorische Wechselwirkungen als Beitrag zur Photoprotektion in Pflanzen
Publisher of your work	TU Braunschweig Universitätsbibliothek
Expected publication date	Sep 2009
Permissions cost	0.00 USD
Value added tax	0.00 USD
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

**STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL
FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL**

1. Use of the material is restricted to your license details specified during the order process.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. For permission to translate any material from an Oxford University Press journal into another language, please email journals.permissions@oxfordjournals.org
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org. Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oxfordjournals.org
7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.
8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance

Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.

10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

Other Terms and Conditions

v1.1

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 30 days of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this license number 2192460375288.

If you would prefer to pay for this license by credit card, please go to <http://www.copyright.com/creditcard> to download our credit card payment authorization form.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

If you find copyrighted material related to this license will not be used and wish to cancel, please contact us referencing this license number 2192460375288 and noting the reason for cancellation.

Questions? customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

9 Lebenslauf

Beruflicher Werdegang

08 / 06 – Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der TU Braunschweig im Institut für Physikalische und Theoretische Chemie

Studium

04 / 08 – Hauptstudium des wirtschaftswissenschaftlichen Aufbaustudienganges für Naturwissenschaftler an der Fernuniversität Hagen; Vertiefung in den Fächern: Allgemeine BWL, Controlling, Marketing und Produktions- und Investitionstheorie

10 / 06 – Weiterbildung im Rahmen des Promotionsstudienganges an der TU Braunschweig

10 / 06 – 03 / 08 Grundstudium des wirtschaftswissenschaftlichen Aufbaustudienganges für Naturwissenschaftler an der Fernuniversität in Hagen, Wirtschaftschemie-Vordiplom mit der Gesamtnote „gut“ (1,7)

03 / 04 – 06 / 06 Hauptstudium der Chemie an der TU Braunschweig, Diplomarbeit in der biophysikalischen Chemie, Gesamtnote „mit Auszeichnung“ (1,0)

08 / 04 – 05 / 05 Auslandsstudium in den USA an der University of Utah als DAAD-Stipendiat

04 / 02 – 02 / 04 Grundstudium der Chemie an der TU Braunschweig, Vordiplom mit der Gesamtnote „sehr gut“ (1,2)

10 / 01 – 03 / 02 Grundstudium der Physik an der Leibniz Universität Hannover

Schulausbildung

08 / 93 – 07 / 00 Gymnasium Groß Ilsede, Abitur mit den Leistungskursen Physik und Chemie, Gesamtnote „gut“ (1,9)

Auszeichnungen / Stipendien

11 / 06 – 10 / 08 Stipendiat des Fonds der chemischen Industrie

02 / 07 Auszeichnung durch die Fakultät für Lebenswissenschaften der TU Braunschweig für das beste Diplom des Jahres 2006

10 / 05 Auszeichnung durch die TU Braunschweig für hervorragende studentische Leistungen

02 / 05 Auszeichnung durch den Fachbereich Chemie der TU Braunschweig für das beste Vordiplom des Jahres 2004

07 / 00 Auszeichnung durch den Fonds der chemischen Industrie für das beste Chemie Abitur

Veröffentlichungen

Bode, S.; Quentmeier, C. C.; Liao, P.-N.; Hafi, N. ; Barros, T.; Wilk, L.; Bittner, F.; Walla, P. J.: On the formation of excitonic carotenoid dark state – chlorophyll states regulating plant photosynthesis, PNAS, accepted (2009)

Bode, S.; Quentmeier, C. C.; Liao, P.-N.; Barros, T.; Walla, P. J.: Xanthophyll-Cycle Dependence of the Energy Transfer Between Carotenoid Dark States and Chlorophylls in NPQ Mutants of Living Plants and LHCII, Chemical Physics Letters 450, 379-385 (2008)

Ernst, R. D.; Harvey, B.; Bode, S; Arif, A.: Crystal structure of 1,3,5-tri(tert-butyl)benzene-cyclopentadienyl-irontrifluorodimethylsilicate, $[\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)\{\text{C}_6\text{H}_3(\text{C}_4\text{H}_9)_3\}][\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{F}_3]$. Zeitschrift für Kristallographie - New Crystal Structures, 222, (3), 337-338 (2007)